

Aus der Klinik und Poliklinik für  
Herzchirurgie, herzchirurgische Intensivmedizin und Thoraxchirurgie  
der Universität zu Köln  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Wahlers

Molekulare Analyse des Signalwegs der  $\alpha$ -1-Antitrypsin-vermittelten  
intrinsischen Apoptose-Resistenz in neutrophilen Granulozyten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Anne-Kathrin Bär  
aus Lutherstadt Wittenberg

promoviert am 13. Februar 2019



Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü von mir selbst durchgeführt worden.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. Thorsten Wahlers für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit im Forschungslabor der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universität zu Köln durchführen zu können.

Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü danke ich besonders für die freundliche Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit, sowie für ihre stets freundlichen und konstruktiven Ratschläge, Anregungen, Kritiken und ihre hervorragende Unterstützung.

Ich möchte außerdem meinem Bruder Christian (Dr. Christian Bär) danken, für dessen Unterstützung und das nötige Ohr, welches er mir etliche Male geschenkt hat.

Des Weiteren danke ich Frank, der mir in zahlreichen mühseligen Stunden immer verständnisvoll zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt ebenso allen freiwilligen Blutspendern, die durch ihr Engagement so vielen Patienten helfen und Forschung wie diese erst ermöglichen.

***Man lebt nicht für die Ewigkeit, sondern für die Augenblicke,  
denen man Ewigkeit wünscht.***

**Gerhard Uhlenbruck**

(\*1929), deutscher Immunbiologe und Aphoristiker

---

gewidmet  
meinem liebsten Armani,  
Frank und meinem Bruder Christian, die mich immer unterstützt haben,  
sowie meiner Schwester Kathleen und meinen liebevollen Eltern.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>9</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Hintergrund.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 SIRS und Sepsis – berechnigte Kritik?.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) .....</b>	<b>17</b>
1.3.1 Herkunft und Reifung.....	17
1.3.2 Lebenszeit.....	18
1.3.3 Zellhomöostase und PMN-Zelltod.....	18
1.3.4 Granula und sekretorische Vesikel.....	19
1.3.5 Tötungsmechanismen.....	19
<b>1.4 Die Rolle und der Weg der PMN im Entzündungsprozess.....</b>	<b>20</b>
1.4.1 <i>Tethering</i> und <i>Rolling</i> .....	22
1.4.2 Aktivierung und Adhärenz.....	23
1.4.3 <i>Crawling</i> und Transmigration.....	23
<b>1.5 Apoptosesignalwege in PMN.....</b>	<b>25</b>
1.5.1 Der extrinsische Signalweg.....	25
1.5.2 Der intrinsische Signalweg.....	26
1.5.3 Signalverstärkung durch Kommunikation beider Signalwege.....	27
1.5.3 Die spontane PMN-Apoptose und deren pathophysiologische Bedeutung.....	28
<b>1.6 Kinasesignalkaskaden – Der Weg zur PMN-Apoptose     und ihr regulatorischer Einfluss.....</b>	<b>30</b>
<b>1.7 Die Akute-Phase-Reaktion und <math>\alpha</math>-1-Antitrypsin (AAT).....</b>	<b>32</b>
<b>1.8 Fragestellung.....</b>	<b>35</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>37</b>

2.1.1	Humanes Probenmaterial.....	37
2.1.2	Geräte.....	37
2.1.3	Verbrauchsmaterialien und Zubehör.....	39
2.1.4	Chemikalien.....	39
2.1.5	Kits.....	41
2.1.6	Genspezifische Primer.....	41
2.1.7	Antikörper.....	42
2.1.8	Puffer und Lösungen.....	42
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>46</b>
2.2.1	$\alpha$ -1-Antitrypsin (AAT) - Immunodepletion aus Patientenseren.....	46
2.2.2	AAT-Konzentrationsbestimmung mittels ELISA.....	46
2.2.3	Herstellung einer reinen Granulozyten-Population aus Buffy Coats..	47
2.2.4	Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-improved-Zählkammer.....	49
2.2.5	Zellkultur.....	51
2.2.6	Apoptosequantifizierung mittels Durchflusszytometrie.....	52
2.2.7	Proteinbiochemische Methoden.....	53
2.2.7.1	Proteinisolierung und –Konzentrationsbestimmung.....	53
2.2.7.2	Diskontinuierliche SDS-PAGE.....	54
2.2.7.3	Western Blot.....	55
2.2.7.4	„Stripping“ der Western Blots.....	56
2.2.8	Caspase-Aktivitäts-Assay.....	56
2.2.9	Molekularbiologische Methoden.....	57
2.2.9.1	Isolierung der Gesamt-RNA.....	57
2.2.9.2	RNA-Quantifizierung und Reinheitsbestimmung.....	58
2.2.9.3	Reverse Transkription.....	58
2.2.9.4	Quantitative <i>Real-Time-PCR</i> .....	59
2.2.10	Statistische Auswertung.....	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>62</b>
3.1	<b>Effekt von AAT auf die STS-induzierte Apoptoserate von PMN.....</b>	<b>62</b>

3.2	AAT-vermittelte Modulation der PMN-Kinasesignalkaskaden PI3K/Akt und MAPK-Erk1/2.....	64
3.3	AAT-vermittelte Modulation des Proteinumsatzes von Mcl-1...	66
3.4	AAT-vermittelte Wirkung auf die STS-abhängige Caspasenaktivität der Caspasen-3/-7 und -9.....	67
3.5	Korrelation zwischen intrinsischer Apoptose-Resistenz und AAT-Genexpression in SIRS-Patientenserum kultivierten PMN.....	68
3.6	Korrelation zwischen intrinsischer Apoptose-Resistenz und AAT-Proteinexpression in SIRS-Patientenserum kultivierten PMN.....	70
4	Diskussion.....	73
5	Zusammenfassung.....	83
6	Literaturverzeichnis.....	85
7	Vorabveröffentlichung von Ergebnissen.....	99
8	Anhang.....	100
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	100
8.2	Tabellenverzeichnis.....	101
9	Lebenslauf.....	102

## Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
AAT	α-1-Antitrypsin
Abb.	Abbildung
AKI	<i>Acute kidney injury</i>
Akt	Proteinkinase B
AMI	Akuter Myokardinfarkt
Apaf-1	<i>Apoptotic protease-activating factor 1</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (Antigenpräsentierende Zelle)
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i> (Akutes Atemnotsyndrom)
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i> Protein
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i> Protein
Bax	<i>Bcl-2-associated X</i> Protein
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i> Protein
BFA	Brefeldin A
BH	Bcl-2 Homologie
Bid	<i>BH3-interacting death domain agonist</i>
Bik	<i>Bcl-2-interacting killer</i> Protein
Bim	<i>Bcl-2-like Protein 11</i> - Bcl-2-Interaktions-Mediator des Zelltodes
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
bspw.	beispielsweise
°C	Grad Celsius
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Unterscheidungsgruppe)
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure (DNA)

COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CPB	<i>cardiopulmonary bypass</i> (kardiopulmonale Bypass)
CRP	C-reaktive Protein
CT	<i>threshold cycle</i> (Schwellenwert-Zyklus)
CXCR4	CXC-Chemokin-Rezeptor 4
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dendritische Zellen
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DEVD	Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	Extrazellulär-regulierte Kinase
E-Selectin	Endothel-Selectin
ESL-1	E-Selectin-Ligand-1
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
fMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
h	<i>hour</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)

IAP	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LEHD	Leucin-Glutamat-Histidin-Aspartat
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LIF	<i>leukocyte inhibitory factor</i>
LPS	Lipopolysaccharide
L-Selectin	Lymphozyten-Selectin
mAb	<i>monoclonal antibody</i>
MAC-1	<i>macrophage-1 antigen</i>
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAP2K	MAP-Kinase-Kinase; auch MEK
MAP3K	MAP-Kinase-Kinase-Kinase; auch MEKK
Mcl-1	<i>myeloid cell leukemia-1</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MNC	<i>mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen)
MOF	<i>multiple organ failure</i> (Multiorganversagen)
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure (RNA)
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i> (Neutrophile extrazelluläre Fallen)
ng	Nanogramm
NGF	<i>nerve growth factor</i> (Nervenwachstumsfaktor)
n.s.	nicht signifikant
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)

PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3/PIP2	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat / -3,4-biphosphat
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMN	polymorphonuclear leukocytes (Granulozyten; hier gleichgesetzt mit neutrophilen Granulozyten)
p.o.	postoperativ
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
P/S	Penicillin / Streptomycin
P-Selectin	platelet Selectin (Thrombozyten-Selectin)
PSGL-1	P-Selectin-Glykoprotein-Ligand-1
Puma	<i>Mitochondrion/p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RBC	<i>red blood cells</i> (Erythrozyten)
RIPA	<i>Radio immunoprecipitation assay</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>revolutions per minute</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (RNA)
RT	Raumtemperatur
SDS-Page	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sec	Sekunden
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i> (Systemisches Inflammatorisches Reaktions-Syndrom)
Smac	<i>second mitochondria-derived activator of caspases</i>
STS	Staurosporin
tBid	<i>truncated (gespaltenes) BH3-interacting death domain</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>

Tn	Neutrophilen-regulatorische T-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VE-Cadherin	<i>vascular endothelial cadherin</i>
VLA-4	<i>very late antigen 4</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund

Weltweit werden jährlich um die 1,5 Millionen Herzoperationen, unter Verwendung eines kardiopulmonalen Bypasses (CPB) zur extrakorporalen Zirkulation, durchgeführt, davon ungefähr 500.000 in Europa und weitere 500.000 in den Vereinigten Staaten von Amerika (Holsworth et al., 2013). 2014 fanden allein in Deutschland in 78 Kliniken knapp 84.000 offene Herzoperationen statt (Beckmann et al., 2015).

Trotz stetigen Weiterentwicklungen in der chirurgischen Technik, des operativen und anästhesiologischen Managements, des technischen Fortschritts der extrakorporalen Zirkulation und einer optimierten Antibiotikatherapie zur perioperativen Prophylaxe, stellen heutzutage die mitunter schwer beherrschbaren postoperativen Infektionen mit einer Inzidenz von 2 - 50 % eine der Hauptkomplikationen dar (Michalopoulos et al., 1998).

Chirurgisches Trauma, Ischämie-Reperfusionsschaden, Endotoxämie und der Blutkontakt zu den Fremdmaterialien des CPB fördern die Aktivierung der Gerinnungskaskade, des Komplementsystems und der zellulären Immunantwort (98). Über verschiedene Wege kommt es zur Endothelzellenaktivierung, Neutrophilenrekrutierung, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und Stickoxid, sowie zur Erhöhung proinflammatorischer Zytokine im zirkulierenden Blut (145).

Das klinische Resultat ist die Entwicklung eines systemischen Entzündungsreaktions-Syndroms (*Systemic inflammatory response syndrome*, SIRS) verbunden mit postoperativen Komplikationen, wie Myokarddysfunktion, akutes Atemnotsyndrom (*Acute respiratory distress syndrome*, ARDS), akutes Nierenversagen (*Acute kidney injury*, AKI), neurologischer Dysfunktionen, Blutgerinnungsstörungen und letztendlich dem multiplen Organversagen (*multiple organ failure*, MOF) welches mit erheblich erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsraten einhergeht (103).

## Einleitung

Welche Faktoren auf molekularbiologischer Ebene, das Auftreten, die Schwere und das klinische Ergebnis der Entzündungsreaktion beeinflussen und insbesondere die Gründe, warum bestimmte Patienten lebensbedrohliche perioperative Komplikationen entwickeln, sind derzeit unzureichend verstanden.

Auf zellulärer Ebene konnte in der Literatur mehrfach ein entscheidender Beitrag der neutrophilen Granulozyten (*polymorphonuclear leukocytes*, PMN) nachgewiesen werden (108). Eine fehlregulierte Apoptose der PMN kann zu erhöhten Zellzahlen und Überaktivitäten dieser mit konsekutiver Schädigung des Organismus führen, was vermutlich die Entstehung eines SIRS begünstigt (92, 149).

In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung des intrinsischen, mitochondrialen Apoptosesignalweges sich als Resistenz gegenüber des Breitspektrumkinaseinhibitors Staurosporin (STS) äußert. STS wird als potenter Apoptoseinduktor für zahlreiche Zelltypen eingesetzt. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der STS-Resistenz in PMN von SIRS-Patienten und erhöhten Leveln des antiapoptotischen Proteins *myeloid cell leukemia-1* (Mcl-1) nachgewiesen werden (Paunel-Görgülü et al., 2009). Weiterhin wurde das Akute-Phase-Protein  $\alpha$ -1-Antitrypsin (AAT) als Mediator der STS-Resistenz in PMN identifiziert.

Ziel, dieser in Teilen bereits publizierten Arbeit, war die Aufklärung des molekularen Signalwegs der AAT-vermittelten intrinsischen Apoptose-Resistenz in PMN und damit einen Beitrag zum besseren Allgemeinverständnis der molekularen Pathophysiologie von Entzündungsreaktionen zu leisten. Langfristig könnten diese Erkenntnisse eine Grundlage für die Identifizierung neuer potentieller Targets zur Limitierung der SIRS- und PMN-vermittelten Organschäden bilden.

## 1.2 SIRS und Sepsis – berechtigte Kritik?

Nach herzchirurgischen Eingriffen (120) oder schweren Traumata (106) erzeugt der ausgelöste Gewebeschaden eine starke systemisch wirksame inflammatorische Antwort, die klinisch mit den SIRS-Kriterien erfasst werden kann.

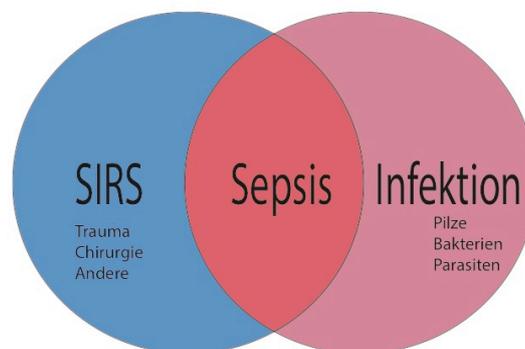
## Einleitung

Der Begriff und die Definition SIRS gehen zurück auf die Veröffentlichung der amerikanischen Konsenserklärung 1992 und dessen Überarbeitung 2001 (15, 108).

Zur Diagnosestellung des SIRS müssen mindestens zwei der folgenden Kriterien vorliegen:

- Körpertemperatur  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  oder  $\leq 36^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz  $\geq 90$  Schläge/min (ohne Einsatz von  $\beta$ -Blockern)
- Atemfrequenz  $\geq 20$  Züge/min oder  $\text{pCO}_2 \leq 32$  mmHg oder maschinelle Beatmung
- Leukozytenzahl  $> 12000/\text{mm}^3$  oder  $< 4000/\text{mm}^3$  oder  $> 10\%$  unreife Formen an neutrophilen Granulozyten

Sepsis wurde als das Vorhandensein eines SIRS in Folge einer Infektion definiert.



**Abbildung 1.1 Venn-Diagramm SIRS – Sepsis – Infektion**

Das Venn-Diagramm zeigt, dass sich eine Sepsis aus der Schnittmenge eines SIRS und einer Infektion ergibt. Die Infektion bezeichnet den Eintritt von Mikroorganismen wie bspw. von Pilzen, Bakterien und Parasiten und dessen Ansiedelung und Vermehrung. SIRS kann in Folge eines Traumas, eines chirurgischen Eingriffs oder vieler anderer nichtinfektiöser Zustände (Pankreatitis, ausgedehnte Verbrennungen) entstehen. Um die Diagnose Sepsis zu stellen, ist der kulturelle Nachweis der Infektion nicht zwingend erforderlich, es genügt der klinische Verdacht der Infektion, bei erfüllten SIRS-Kriterien (50).

Die Bedeutung der SIRS-Kriterien wird in letzter Zeit jedoch kontrovers diskutiert. Da sie eine hohe Sensitivität und sehr niedrige Spezifität aufweisen, bekommt fast jeder intensivpflichtige chirurgische Patient die Diagnose SIRS gestellt (162). Neuere Studien zeigten eine Inzidenz für SIRS von fast 50 % aller stationären Patienten während ihres Krankenhausaufenthalts und stellen den prognostischen Nutzen für Screenings nach den SIRS-Kriterien zur frühzeitigen Identifizierung einer Sepsis in Frage (33).

Trotz dieser vermeidlichen Schwächen befürworten viele Autoren die SIRS-Kriterien als nützliches Tool zur Dokumentation und Prognoseeinschätzung im Fall einer

## Einleitung

Sepsis bei Krankenhausaufnahme (37). Weiterhin sprechen die Verwendung als Einschlusskriterien in über 100 klinischen Studien allein im Zeitraum zwischen erster und zweiter Konsenserklärung für sich (197). Die Unterscheidung zwischen infektiösem und nicht infektiösem Zustand kann mit den SIRS-Kriterien allein nicht vollbracht werden. Dies spielt jedoch primär eine untergeordnete Rolle, für die zügige klinische Beurteilung ob sich ein Patient in einem kritischen Zustand befindet oder nicht, zumal die Mortalitätsraten zwischen der infektiösen Sepsis und dem nicht-infektiösem SIRS vergleichbar sind (49).

So stehen auch die aktuellsten Empfehlungen der dritten Überarbeitung von 2016 bereits stark in der Kritik, da in ihr die SIRS-Kriterien in der Sepsisdiagnostik gestrichen wurden (181). Die SIRS-Kriterien sind klinisch relevante Parameter für septische Patienten und sollten ein wichtiger Bestandteil des diagnostischen Prozesses bleiben, fordert Simpson (Simpson, 2017). Weiterhin ist und bleibt das SIRS ein wertvoller Begriff für die Diskussion über Patienten mit lebensbedrohlichen Organfunktionsstörungen infektiöser oder nicht infektiöser Genese.

### **1.3 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)**

PMN oder kurz „Neutrophile“ sind mit einem Anteil von 50 – 70 % die am häufigsten vorkommenden weißen Blutkörperchen (Leukozyten) im zirkulierenden Blut (126). Ein reifer PMN hat einen durchschnittlichen Durchmesser von 7 -10 µm, der Zellkern ist segmentiert und im Zytoplasma befinden sich Granula und sekretorische Vesikel (16). Sie sind als erste Verteidigungslinie des angeborenen unspezifischen Immunsystems einer der Hauptakteure während einer akuten Infektion. Am Ort der Entzündung werden Sie typischerweise als erste Leukozyten rekrutiert und sind in der Lage Pathogene wie Bakterien, Pilze und Protozoen effektiv zu eliminieren (1, 72, 97).

#### **1.3.1 Herkunft und Reifung**

PMN entstammen, wie alle zellulären Blutbestandteile, den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Sie werden kontinuierlich aus myeloiden Vorläuferzellen gebildet und als reife, terminal ausdifferenzierte Zellen ins Blut sezerniert. Während ihrer Reifung durchlaufen sie mehrere Stadien, vom

## Einleitung

Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten, Metamyelozyten, über den stabkernigen PMN schließlich hin zum polymorphkernigen (segmentierten) PMN (Borregaard, 2010). Dieser Reifungsprozess wird durch den Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF) kontrolliert (112), welcher von spezialisierten Neutrophilen-regulatorischen T-Zellen (Tn) ( $\gamma\delta$  T-Zellen und unkonventionelle  $\alpha\beta$  T-Zellen) als Reaktion auf das proinflammatorische Interleukin 17A (IL-17A) gebildet wird (110). Die Freisetzung von IL-17A erfolgt wiederum unter der Kontrolle von Interleukin 23 (IL-23), welches aus gewebeansässigen Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) stammt (186).

### 1.3.2 Lebenszeit

Im Vergleich zu anderen Leukozyten werden PMN als sehr kurzlebig angesehen. Ihre durchschnittliche Halbwertszeit im zirkulierenden Blut wird mit ca. 5 – 10 h angegeben (Galli et al., 2011). Diese kann bei einer Entzündung oder Infektion deutlich verlängert werden. Eine 2010 durchgeführte Studie stellte eine durchschnittliche Zirkulationslebensdauer von 5,4 Tagen bei aktivierten PMN fest, was eine Erhöhung der Langlebigkeit um ein Vielfaches bedeutet (Pillay et al., 2010).

### 1.3.3 Zellhomöostase und PMN-Zelltod

Täglich können bis zu  $2 \times 10^{11}$  humane PMN gebildet werden (16). Um möglichst konstante Zellzahlen im Blut aufrechtzuerhalten, muss eine homöostatische Regulierung erfolgen, bei der die PMN-Produktion der PMN-Elimination entspricht (186).

Unter physiologischen Bedingungen unterliegt der PMN-Zelltod der spontanen (konstitutiven) Apoptose, mit anschließender Eliminierung aus dem Blutkreislauf über Leber, Milz und Knochenmark (60, 82, 174). In gealterten Neutrophilen wurde diesbezüglich eine erhöhte Expression des CXC-Chemokin-Rezeptors 4 (CXCR4) beobachtet, mit dem sie zurück ins Knochenmark gelangen, um dort anschließend eliminiert zu werden (51). Zudem konnte ein negativ regulierender Einfluss auf die Freisetzung neu entwickelter PMN gezeigt werden (190).

Intravaskulär apoptotische Neutrophile, sowohl seneszente als auch aktivierte, können durch Kupffer-Zellen der Leber (im Lebergefäßsystem immobilisierte Makrophagen) oder dendritische Zellen phagozytiert werden (82, 176). Dies wird

## Einleitung

hauptsächlich über die bereits erwähnte IL-23 – IL-17A – G-CSF – Zytokin-Achse reguliert (186)

### **1.3.4 Granula und sekretorische Vesikel**

Damit die PMN ihrer Rolle im Immunsystem gerecht werden können, werden sie sequentiell während der granulozytischen Differenzierung im Knochenmark mit drei Arten von Neutrophilengranula und sekretorischen Vesikeln ausgestattet (Galli et al., 2011). Basierend auf dem Vorhandensein charakteristischer Granulaproteine werden sie in primäre (azurophile oder peroxidase-positive) Granula mit Myeloperoxidase (MPO), sekundäre (spezifische oder peroxidase-negative) Granula mit Lactoferrin und tertiäre Gelatinase-Granula unterteilt (Borregaard, 2010). Zusätzlich zu diesem wichtigen Reservoir an antimikrobiellen Proteinen, Proteasen und Komponenten der respiratorischen Burst-Oxidase, bekommen sie auch eine Vielzahl an membrangebundenen Rezeptoren für endotheliale Adhäsionsmoleküle, extrazelluläre Matrixproteine, bakterielle Produkte und lösliche Mediatoren der Entzündung (Faurischou et al., 2003).

### **1.3.5 Tötungsmechanismen**

Ausgestattet mit dem nötigen „Werkzeug“ zur Abwehr von Pathogenen stehen dem PMN verschiedene intra- als auch extrazelluläre Tötungsmechanismen zur Verfügung.

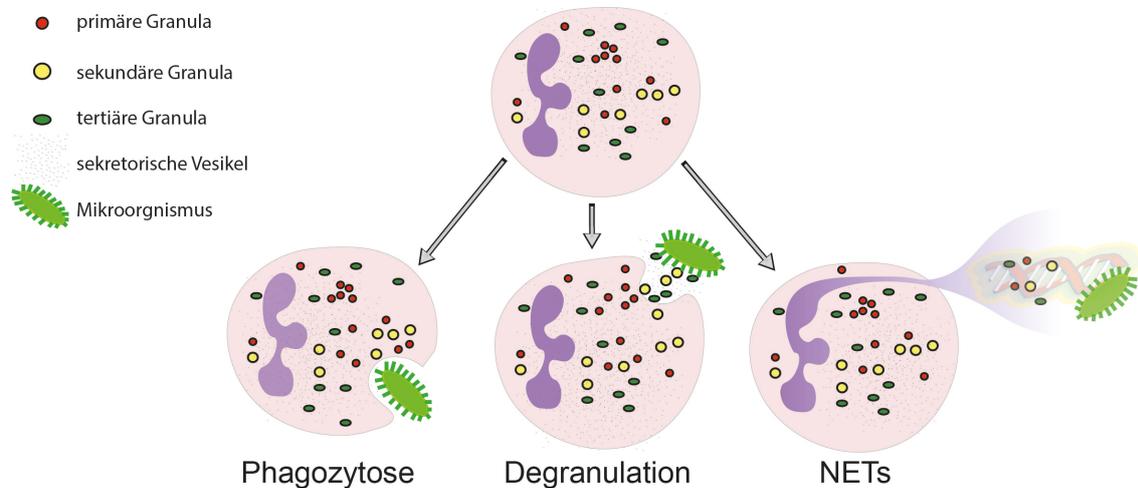
Eine intrazelluläre Möglichkeit ist die Phagozytose des Erregers mit anschließender Entleerung der eben beschriebenen Granula ins Phagosom. In Diesem eingekapselt werden die Mikroorganismen unter Verwendung von NADPH-Oxygenase-abhängigen Mechanismen, wie der Freisetzung von ROS oder durch Freisetzung antibakterieller Proteine wie Cathepsine, Defensine, Lactoferrin und Lysozym, getötet (210).

Eine der extrazellulären Varianten ist die Degranulation, bei der die Neutrophilengranula in das extrazelluläre Milieu freigesetzt werden und dort auf die Pathogene wirken (Kolaczowska et al., 2013).

Eine weitere, noch nicht so lang bekannte, extrazellulär wirkende Methode ist die Freisetzung neutrophiler extrazellulärer Fallen (*neutrophil extracellular traps*, NETs). NETs bestehen aus dekondensiertem Chromatin, an das Histone, Proteine (z. B. Lactoferrin, Cathepsine) und Enzyme (z. B. MPO, neutrophile Elastase) welche aus

## Einleitung

Neutrophilengranula freigesetzt werden, angehängt sind (20). Sie werden aus dem aktivierten PMN geschleudert, was zur Immobilisierung oder direkten Tötung einer Vielzahl von Mikroben, einschließlich Bakterien, Pilzen und Parasiten führt (146).



**Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der PMN-Tötungsmechanismen**

Dem PMN stehen zur Abwehr von Pathogenen drei Möglichkeiten zur Verfügung.

Links: Die Phagozytose ist eine Form der rezeptorvermittelten Endozytose mit intrazellulärem Abbau. Der PMN internalisiert durch Bildung eines Phagosoms den Mikroorganismus. Durch anschließende Verschmelzung der Neutrophilengranula (vorwiegend azurophile und spezifische), wird der Mikrobe im entstandenen Phagolysosom getötet und verdaut (nicht dargestellt).

Mitte: Werden die Neutrophilengranula (vorwiegend spezifische und Gelatinase-Granula) nach extrazellulär abgegeben, spricht man von Degranulation.

Rechts: NETs *neutrophil extracellular traps* (neutrophile extrazelluläre Fallen) bezeichnet das Ausschleudern von dekondensiertem Chromatin, an das Histone, Proteine (z. B. Lactoferrin, Cathepsine) und Enzyme (z. B. MPO, neutrophile Elastase) aus den neutrophilen Granula angehängt sind und den Mikroben extrazellulär immobilisieren oder direkt töten.

Modifiziert nach Kolaczkowska et al. (Kolaczkowska et al., 2013).

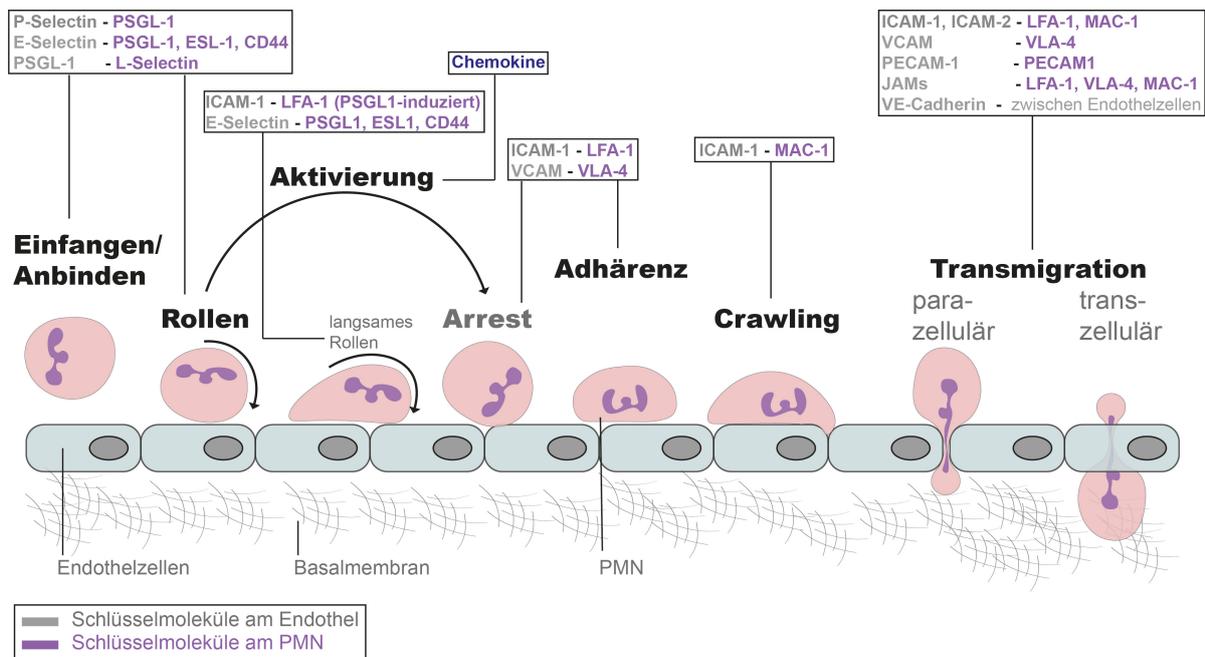
## 1.4 Die Rolle und der Weg der PMN im Entzündungsprozess

Die Rolle der PMN im Entzündungsprozess begann sich Anfang der 90er stark zu wandeln. In zahlreichen Publikationen wurden die aktivierten PMN als fundamentale Teilnehmer der akuten Entzündungsreaktion beschrieben, die in der Lage sind, diese zu verändern und die Immunantwort zu modulieren (Dubravec et al., 1990). Die neue erweiterte Sicht auf die PMN-Biologie umfasste die Erkenntnis, dass sie eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine synthetisieren und freisetzen können (34, 47, 119). Sie exprimieren den *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Klasse-I sowie den MHC-Klasse-II und sind damit als Antigenpräsentierende Zellen (APC) direkt an der Immunantwort beteiligt (69). Sobald der PMN ins Gewebe rekrutiert,

## Einleitung

kann er komplex bidirektional mit Makrophagen, mesenchymalen Stammzellen, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen und B- und T-Lymphozyten interagieren (Mantovani et al., 2011). PMN sind somit zu Schlüsselkomponenten der Effektor- und Regulationskreise des angeborenen und des adaptiven Immunsystems geworden (138).

Damit der PMN seinen intravasalen Patrouillengang beenden und an den Ort der Entzündung migrieren kann, bedarf es seiner Aktivierung im Rahmen der mehrstufigen Leukozyten-Rekrutierungskaskade, bestehend aus folgenden Schritten: Anbinden oder Einfangen (*tethering*), Rollen (*rolling*), Adhärenz, Kriechen (*crawling*) und schließlich der para- oder transzellulären Transmigration (159). Ort der Extravasation sind meist postkapilläre Venolen (16).



**Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Leukozyten-Rekrutierungskaskade und der beteiligten endothelialen und neutrophilen Schlüssel-moleküle**

Zunächst wird der zirkulierende PMN „eingefangen“ und rollt auf dem Endothel, was durch die Interaktionen von Selectin und deren Liganden vermittelt wird. Vor Integrin-vermitteltem Arrest und Adhärenz, erfolgt die durch Chemokine vermittelte Aktivierung. Anschließend beginnt der PMN mit dem *Crawling* (Kriechen) entlang des Gefäßendothels zur geeigneten Stelle für die para- oder transzelluläre Transmigration. Die an jedem Schritt beteiligten endothelialen und leukozytären Schlüssel-moleküle sind unterschiedlich farbig in den Boxen dargestellt. Modifiziert nach Ley et al. (Ley et al., 2007).

ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; JAM, junctional adhesion molecule; LFA-1, lymphocyte function-associated antigen 1 ( $\alpha_L\beta_2$ -Integrin); MAC-1, macrophage antigen 1; PSGL-1, P-Selectin glycoprotein ligand 1; PECAM-1, platelet endothelial-cell adhesion molecule 1; VCAM-1, vascular cell-adhesion molecule 1; VE-Cadherin, vascular endothelial cadherin; VLA-4, very late antigen 4 ( $\alpha_4\beta_1$ -Integrin).

### 1.4.1 *Tethering* und *Rolling*

Die PMN-Rekrutierung wird initiiert durch Oberflächenveränderungen des Endothels, die durch Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren einschließlich Histamin, Cysteinyl-Leukotriene und Zytokine wie IL-1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) aus gewebeansässigen Sentinel-Leukozyten induziert wird (171). Diese werden wiederum durch verschiedene Stimuli, insbesondere *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) aktiviert (209). Endothelzellen können auch direkt durch einen *pattern-recognition-receptor* (PRR) -vermittelten Nachweis von Pathogenen aktiviert werden.

Infolge der Endothelzellenaktivierung wird die Expression von Adhäsionsmolekülen wie P-Selectin (*platelet*; Thrombozyten-Selectin) und E-Selectin (Endothel-Selectin), sowie von Mitgliedern der *cell adhesion molecules* (CAMs), wie der *intercellular adhesion molecules* (ICAMs) und *vascular cell adhesion molecules* (VCAMs) erhöht.

Binnen Minuten wird in vorab ruhenden Endothelzellen gespeichertes P-Selectin aus Weibel-Palade-Körperchen und innerhalb von 90 Minuten *de novo* synthetisiertes E-Selectin in die apikale Zellmembran transloziert (159). Beide Selectine haben teilweise überlappende Funktionen und maximieren die Rekrutierung von PMN. An der Endotheloberfläche angekommen, binden sie transient an ihre glykosylierten Liganden, einschließlich P-Selectin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), E-Selectin-Ligand-1 (ESL-1) und *cluster of differentiation-44* (CD)-44 (Zarbock et al., 2011). PSGL-1 und Lymphozyten-Selectin (L-Selectin) werden konstitutiv an den Spitzen der PMN-Mikrovilli exprimiert (22, 24).

Obwohl die Hauptaufgabe von L-Selectin darin besteht, Lymphozyten in Lymphknoten zu rekrutieren (5), kann die L-Selectin-Expression zirkulierender PMN, deren sekundäre Bindung an einen bereits rollenden PMN erleichtern (9), oder sie kann zu nachgeschalteten Signalvorgängen beitragen, die das Anbinden oder Transmigrieren ermöglichen (218).

Die Bindung von PSGL-1 an P-Selectin und E-Selectin führt zum Anbinden bzw. Einfangen freifließender PMN. E-Selectin und ESL-1 vermitteln das nachfolgende Rollen, während die E-Selectin-Bindung an CD44 eine Umverteilung von PSGL-1 und L-Selectin die Bildung von Clustern vermitteln, einhergehend mit der Reduktion der Rollgeschwindigkeit (78).

## Einleitung

Die Stärke der transienten Selectin-vermittelten Bindungen hängt vom Maß der Scherspannung im Gefäß ab, die durch den laminaren Blutfluss erzeugt wird (109). Tatsächlich lösen sich die rollenden Zellen, wenn der Fluss stoppt bzw. werden adhärenter bei zunehmender Scherspannung. Dies erklärt sich aus dem Bindungsverhalten der Selectine (122) und den Transportphänomenen der Selectin-Liganden-Selectin-Verbindungen, die durch die Rollbewegung der Zelle hervorgerufen werden und die Dissoziation der P-Selektin-PSGL-1-Bindungen an der Zellrückseite mit der Bildung neuer Bindungen an der Vorderseite ausgleichen (214).

### 1.4.2 Aktivierung und Adhärenz

Die Aktivierung der PMN wird durch die immer langsamer werdende Rollbewegung und dem damit verbundenen engen Kontakt zum Endothel begünstigt. Der vollständigen Aktivierung geht das *Priming* der PMN voraus und bedingt, dass die Neutrophilenaktivierung ein zweistufiger Prozess ist (190). Dem spezifischen *Priming* durch proinflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  oder durch Kontakt mit aktivierten Endothelzellen, folgt die Exposition gegenüber PAMPs wie Endotoxin, Chemoattraktanten oder Wachstumsfaktoren einschließlich IL-8 und Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) (Summers et al., 2010). *Priming* ist Voraussetzung für eine maximale Neutrophilen-Degranulation und Aktivierung der NADPH-Oxidase (73)

Durch G-Protein-gekoppelte Chemokinrezeptor-Aktivierung auf den PMN kommt es zu einer Konformationsänderung von oberflächlichen Integrin-Adhäsionsmolekülen mit anschließender Affinitätssteigerung für ihre Liganden. Neutrophile exprimieren konstitutiv hohe Konzentrationen der  $\beta$ 2-Integrine *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) (=  $\alpha_L\beta_2$ , CD11a/CD18) und *macrophage-1 antigen* (MAC-1) (=  $\alpha_M\beta_2$ , CD11b/CD18), die nach der Konformationsänderung an ihre endothelialen Liganden wie ICAM-1 und ICAM-2 binden (156). Für den Arrest der PMN und die feste Adhärenz am Endothel ist die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 essentiell (105).

### 1.4.3 *Crawling* und Transmigration

*Crawling* ist die Bezeichnung für das PMN-Kriechen entlang des Endothels zum Ort der Transmigration. Entscheidend für das intravaskuläre Kriechen von PMN ist die Interaktion von ICAM-1 und MAC-1 (156). Im Vorfeld führen einige der anhaftenden

## Einleitung

PMN ein durch Pseudopodien-Extension-vermitteltes "Sondierungsverhalten" durch, wobei sie aktiv die Umgebung abzutasten scheinen (97).

Die Transmigration kann parazellulär (zwischen Endothelzellen) oder transzellulär (durch eine Endothelzelle) erfolgen, wobei beide Wege wahrscheinlich koexistieren. Die vorherrschende Meinung ist, dass PMN bevorzugt zu trizellulären Ecken des Endothels kriechen und diese parazellulär passieren (23). An diesen Zellkontakten ist die Ausrichtung der Endothelzellen weniger gut organisiert (189) und es sind weniger junctionale Proteine vorhanden (211). Scherspannung hingegen veranlasst, PMN zum gerichteten Kriechen senkrecht zum Blutfluss (157), und die Endothelzellarchitektur zur Verlängerung in Flussrichtung (43), womit der transzelluläre Weg unter diesen Bedingungen die kürzere Alternative darstellt.

Die Transmigration erfordert Integrine und CAMs (ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1) sowie verschiedene Verbindungsproteine, einschließlich des *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1) und des *junctional adhesion molecule* (JAM) (212).

Für den parazellulären Prozess müssen Endothelzellverbindungen geöffnet werden. Dies wird durch die Dissoziation von *vascular endothelial cadherin* (VE-Cadherin), einer junctionalen interzellulären Proteinbindung, welche in Kontaktstellen aneinandergrenzender Endothelzellen vorkommt, initiiert (Broermann et al., 2011). Zum transzellulären Prozess tragen eine hohe Dichte der ICAM-1 sowie die distal agierende endotheliale Guanosin triphosphatase RhoG bei (199, 215). Als Reaktion auf die bereits erwähnte Adhärenz durch PMN-Bindung an das endotheliale ICAM-1, wirft das Endothel dynamische Membranvorsprünge auf und bildet eine Art Becher, der die adhärenenten Neutrophilen teilweise kuppelartig umgibt (158, 199).

Um zum Ort der Entzündung zu migrieren, stellt die kontinuierliche Endothelbasalmembran, bestehend aus extrazellulären Matrixproteinen einschließlich Kollagenen und Lamininen, eine weitere Hürde dar. Aus diesem Grund nutzen vermutlich PMN bevorzugt Regionen in der Basalmembran die geringere Mengen an extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen IV, Laminin 10 und Nidogen 2 exprimieren (<60%) (203). Darüber hinaus sind diese Bereiche mit Lücken zwischen den Perizyten assoziiert (164). Perizyten befinden sich zwischen den Endothelzellen mikrovaskulärer Gefäße und dem interstitiellen Gewebe und

## Einleitung

stabilisieren mit ihren Fortsätzen das Gefäß von außen. Sie können als Wegweiser für transmigrierte PMN dienen, da sie fähig sind DAMPs zu erkennen, sowie unter inflammatorischen Bedingungen vermehrt Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 zu exprimieren und Chemokine wie *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) zu sekretieren (Stark et al., 2012).

Im extravaskulären Gewebe angekommen, wandern die PMN der Chemotaxis folgend entlang von Kapillaren und Arteriolen zum Ort der Entzündung, wo sie schließlich ihre Effektorfunktionen erfüllen (77) (siehe 1.3.5).

### 1.5 Apoptosesignalwege in PMN

Der als Apoptose bezeichnete programmierte Zelltod ist ein genetisch regulierter zellulärer Selbstmordmechanismus, der essentiell für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase in vielzelligen Organismen ist (193).

Die Apoptose kann über zwei Signalwege eingeleitet werden: über einen extrinsischen Weg, durch Liganden-Bindung an einen auf der Zellmembran sitzenden Todesrezeptor, und über einen intrinsischen Signalweg, durch mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c und anderer proapoptotischer Proteine (70). Beide Wege führen zur Aktivierung von spezifischen Proteasen, den Caspasen (Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen). Caspasen vermitteln als Bestandteil einer Enzymkaskade durch hochspezifische proteolytische Aktivität in der sterbenden Zelle, die Spaltung intrazellulärer Proteine und durch Aktivierung weiterer Enzyme wie der Nuklease, die Spaltung der genomischen DNA, was letztendlich zur typischen strukturellen Veränderung der Zelle führt und den apoptotischen Phänotyp manifestiert (99, 116, 139).

#### 1.5.1 Der extrinsische Signalweg

Die Todesrezeptoren des extrinsischen Apoptosesignalwegs gehören zur TNF / Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*, NGF) -Rezeptor-Superfamilie (7). Mit ihrer Todesdomäne (*death domain*, DD), einer homologen zytoplasmatischen Sequenz, können sie nach Liganden-Bindung (z.B Fas-Ligand, FasL) die

## Einleitung

apoptotische Maschinerie in Gang setzen (136). PMN exprimieren eine Vielzahl an Todesrezeptoren, bspw. Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1; auch p55TNF-Rezeptor oder CD120a), und CD95-Rezeptor (auch Apo-1 oder Fas-Rezeptor, FasR), die wohl zu den am besten charakterisierten Todesrezeptoren gehören (29, 135, 177). Ein weiterer ist der *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)-Rezeptor, um nur ein paar Vertreter zu nennen (113, 167).

Nach Ligation resultiert die Trimerisierung der Todesrezeptoren mit anschließender Rekrutierung und Oligomerisierung von Adapterproteinen und Procaspasen. Das Adaptorprotein *Fas-associated death domain* (FADD) wird direkt für ligiertes Fas (und indirekt für ligiertes TNFR1) rekrutiert (70). FADD besitzt eine Todesdomäne mit der es an die intrazelluläre Todesdomäne von Fas bindet und eine Todeseffektordomäne (*death effector domain*, DED) über die es an die DED der Procaspase-8 bindet (Siegel et al., 2000). Der so entstandene *death-inducing signaling complex* (DISC) führt über autokatalytische Aktivierung von Procaspase-8 zur aktiven Initiator-Caspase-8, die ihrerseits die Caspasenkaskade mit weiteren Effektorcaspasen, wie Caspasen -3, -6 und -7 aktiviert (172).

### 1.5.2 Der intrinsische Signalweg

Der intrinsische Apoptosesignalweg wird durch verschiedene Arten von zellulärem Stress ausgelöst (70). Dazu gehören DNA-Schädigungen, falsch gefaltete Proteine, Entzug von Wachstumsfaktoren oder Zellschädigungen in Folge von Hypoxie oder Bestrahlung (74).

Die Regulation des Signalwegs unterliegt Proteinen der *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2)-Familie, welche entweder anti- oder proapoptotische Funktionen erfüllen (Zaman et al., 2014). Die Mitglieder unterscheiden sich durch Anwesenheit von bis zu vier verschiedenen *Bcl-2 homology domains* (Bcl-2 Homologie Domänen, BH), welche als BH 1-4 bezeichnet werden (100). Vereinfacht kann man sagen, dass die Bcl-2-Mitglieder die alle vier Domänen enthalten, wie das der Proteinfamilie gleichnamige Bcl-2, sowie Bcl-extra large (Bcl-xL) und Mcl-1 antiapoptotisch sind, während diejenigen, die weniger BH-Domänen enthalten, proapoptotisch sind (216).

Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine inhibieren die Apoptose, durch Hemmung proapoptotischer Bcl-2-Proteine, wie bspw. Bax und Bak. BH3-only Proteine (Bid, Bad, Bik, Bim, Noxa und Puma), welche durch verschiedene Zelltodsignale entweder transkriptionell oder posttranskriptional aktiviert werden, inhibieren

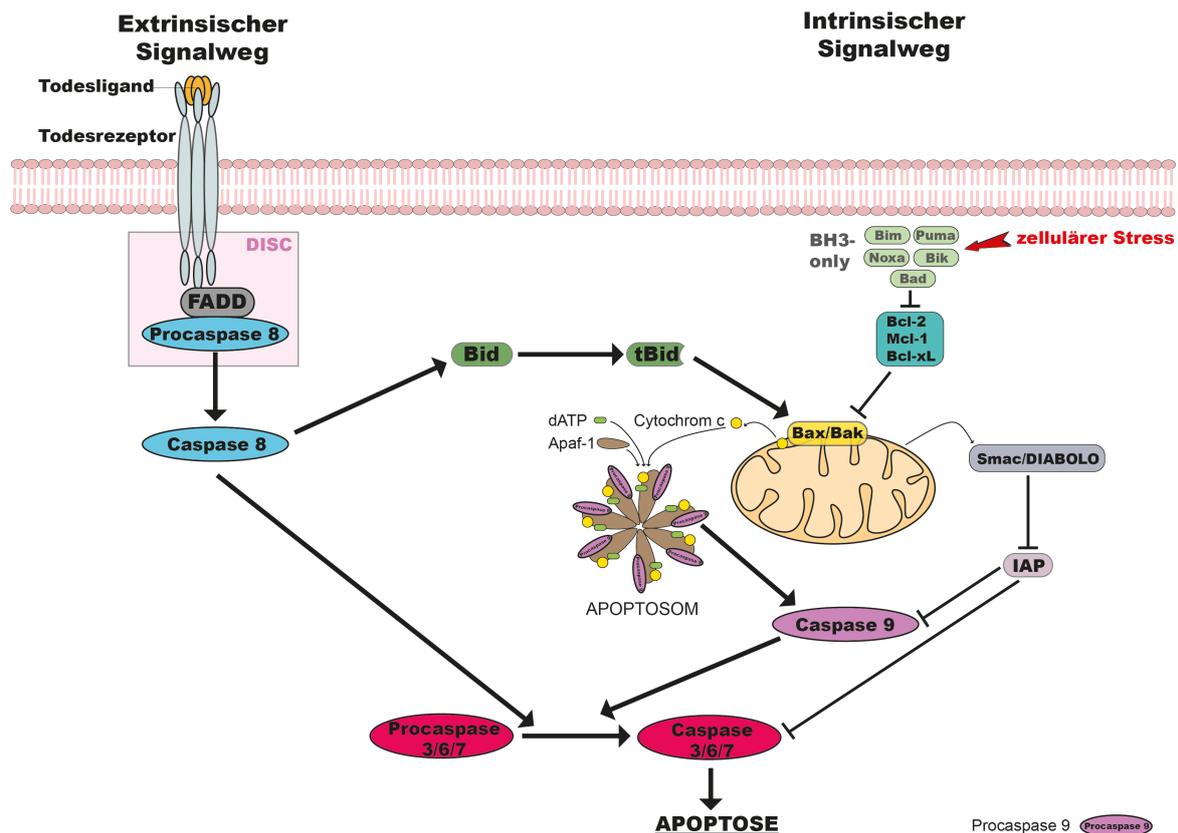
## Einleitung

wiederum die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine (Lomonosova et al., 2009). In Folge dessen kommt es zur Bax- und Bak-Oligomerisierung, was zur Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) und zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie *second mitochondria-derived activator of caspases* (Smac, auch DIABLO genannt) und Cytochrom c aus dem Intermembranraum führt (30, 205). Im Zytosol bildet Cytochrom c mit *apoptotic protease-activating factor 1* (Apaf-1), Desoxyadenosintriphosphat (dATP) und der Initiator Procaspase-9 einen Komplex, auch bekannt als Apoptosom, aus. Dieses wandelt Procaspase-9 in aktive Caspase-9 um, welche ihrerseits (analog der Caspase-8) die Effektorcaspase-3 aktiviert (111). Gleichzeitig hemmt Smac/DIABLO die *inhibitor of apoptosis proteins* (IAP) und verhindert somit, im Sinne einer Caspasen-Disinhibition, dass sie die Prozessierung und Aktivierung von Procaspase-9 inhibieren (42, 201).

### 1.5.3 Signalverstärkung durch Kommunikation beider Signalwege

In einigen Zelltypen, zu denen auch die PMN gehören, kann der extrinsische Signalweg auch mit dem intrinsischen Signalweg kommunizieren und so eine Signalverstärkung bewirken. Dazu spaltet Caspase-8 das zytosolische BH3-only Protein *BH3-interacting death domain agonist* (Bid) zu trunkiertem Bid (*truncated Bid*, tBid), das anschließend zu den Mitochondrien transloziert, die MOMP mit Freisetzung proapoptotischer Faktoren aktiviert und über Caspase-9 die Caspasenkaskade initiiert (217). In Abb. 4 ist vereinfacht der extrinsische und intrinsische Apoptosesignalweg und deren Kommunikation über Bid dargestellt.

## Einleitung



**Abbildung 1.4** Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Signalwegs

Der intrinsische Weg wird durch zellulären Stress aktiviert, wodurch die BH3-only Proteine (Bik, Bim, Bad, Noxa, Puma) die antiapoptotische Bcl-2-Proteine (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL) inhibieren. Dies induziert die Bax/Bak-Oligomerisierung und Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran mit anschließender Freisetzung von Cytochrom c und Smac/DIABLO. Cytochrom c, Apaf-1, dATP und Procaspase-9 bilden das Apoptosom, was zur Aktivierung von Caspase-9 führt. Caspase-9 aktiviert die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) und induziert den Zelltod.

Der extrinsische Weg wird durch Ligand des Todesliganden an den Todesrezeptor aktiviert, wodurch der *death-inducing signaling complex* (DISC) gebildet wird, der zur autokatalytischen Aktivierung der Procaspase-8 zur aktiven Caspase-8 führt, die ihrerseits die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) aktiviert.

Die Kommunikation beider Wege erfolgt durch Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid zu tBid, was die Bax/Bak-Oligomerisierung aktiviert und so über den mitochondrialen Weg zur Apoptoseinduktion führt.

### 1.5.4 Die spontane PMN-Apoptose und deren pathophysiologische Bedeutung

Die spontane (konstitutive) Apoptose der PMN unterliegt vermutlich in erster Linie dem intrinsischen mitochondrialen Signalweg und kann durch eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren einschließlich GM-CSF, TNF- $\alpha$  und bakterieller Produkte wie Lipopolysaccharide (LPS) moduliert bzw. hinausgezögert werden (2). Obwohl auch der extrinsische Signalweg in PMN nachweisbar ist, wird die Annahme der primär intrinsischen spontanen Apoptose durch Beobachtungen in Mäusen mit

## Einleitung

dysfunktionalem FasR/FasL, bei denen die spontane Apoptoserate der PMN nicht beeinträchtigt ist, gestützt (55). Des Weiteren bewiesen Watson und Kollegen bei inflammatorisch aktivierten PMN eine Resistenz gegenüber proapoptotischer Signale, die aus der Fas-Ligation resultierten (204).

Als Auslöser der spontanen Apoptose in reifen PMN gelten, die durch NADPH-Oxidase generierten ROS, granuläre Proteasen und Veränderungen im Gleichgewicht von pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen (Geering et al., 2011). Dabei scheint die Konzentrationsabnahme des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 eine entscheidende Rolle zu spielen (Moulding et al., 2001). Während die proapoptotischen Proteine (Bad, Bax, Bak, Bik) lange Halbwertszeiten haben, extrem stabil sind und trotz Änderungen der *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA)-Spiegel für diese Genprodukte sehr konstante Proteinspiegel aufweisen, sind Mcl-1-Proteine einem schnellen Umsatz unterworfen und deren Transkripte sehr instabil (132). Es ist allgemein anerkannt, dass die Mcl-1-Proteinspiegel mit dem PMN-Überleben korrelieren und dass unter Zytokineinfluss die Genexpression induziert werden kann (133).

Die Bedeutung einer strengen Regulation der Apoptose in PMN wird besonders unter pathologischen Bedingungen deutlich. So zeigten zahlreiche Publikationen das die Neutropenie, in Folge eines beschleunigten PMN-Todes, bspw. nach Chemotherapie, Knochenmarktransplantation oder kongenital häufig mit bakteriellen und Pilzinfektionen vergesellschaftet ist (18, 38, 128).

Ebenso ungünstig kann sich die Neutrophilie präsentieren, in Folge eines verzögerten PMN-Todes. Es resultieren verlängerte PMN-Lebenszeiten und verstärkte Akkumulationen am Entzündungsort durch Hemmung der Apoptose. Dies stellt in erster Linie einen physiologischen Prozess dar, um Pathogene zu bekämpfen und Gewebeschäden zu beheben. Kommt es allerdings zur Hyperinflammation des Immunsystems verbunden mit einer verzögerten PMN-Apoptose kann eine übermäßige Freisetzung toxischer Metaboliten zu Gewebeverletzungen mit nachfolgenden Organfunktionsstörungen führen (13, 179). Neutrophilie ist häufig mit Infektions- und Autoimmunkrankheiten assoziiert, so konnte ein Zusammenhang zwischen verzögerter PMN-Apoptose und

## Einleitung

verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, wie Pankreatitis, ARDS, Sepsis und Rheumatoider Arthritis gezeigt werden (53, 65, 124, 143).

Die PMN-Apoptose und vor allem die korrekte Regulation dieser sind essentiell für die Zellhomöostase und gewährleisten unter physiologischen Bedingungen eine effiziente Beseitigung von Pathogenen und ein Abklingen von Entzündungen (184).

### **1.6 Kinasesignalkaskaden – Der Weg zur PMN-Apoptose und ihr regulatorischer Einfluss**

Entzündliche Signale werden durch Bindung von Adaptormolekülen an die PRRs, Proteinkinasen und Phosphatasen in die Zelle transduziert und über verschiedene Signalkaskaden im Zytoplasma gesteuert, mit dem Ergebnis einer zügigen posttranskriptionalen oder posttranslationalen Modulation einer Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren oder der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (137).

Bereits 1996 lieferten Wei und Kollegen den Beweis dafür, dass Tyrosinkinasen (am Bsp. Lyn) eine Schlüsselrolle bei der Hemmung der PMN-Apoptose spielen (206). Tyrosinkinasen sind Enzyme, die ihre Target-Proteine an der Aminosäure Tyrosin reversibel phosphorylieren. Im Rahmen des Humangenomprojekts zur Sequenzierung des menschlichen Genoms wurden rund 90 Tyrosinkinasen identifiziert, davon sind 58 Rezeptor-Tyrosinkinasen, welche als Transmembranrezeptoren zur Autophosphorylierung fähig sind (170). Durch Aktivierung der Tyrosinkinase wird eine Phosphorylierungskaskade in Gang gesetzt, die die Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt (auch Proteinkinase B) – Signalwegs sowie des mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) - Signalwegs auslöst (26, 27).

Bei dem MAPK-Signalweg handelt es sich um einen mehrstufigen Signaltransduktionsweg der drei hintereinander geschaltete Kinasen aktiviert: die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K), die MAP-Kinase-Kinase (MAP2K, auch MEK) und als letztes die MAP-Kinase (MAPK) (Kyriakis et al., 2012). Sie phosphorylieren ihre Targetproteine an spezifischen Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Resten. Dabei wird die Serin/Threonin-selektive MAPK über gleichzeitige Tyrosin- und Threonin-Phosphorylierung durch die MAP2K aktiviert (101). Die MAP-Kinasen

## Einleitung

werden in vier Gruppen unterteilt: die extrazellulär regulierten Kinasen (Erk)-1/2, die C-Jun N-terminalen Kinasen (JNK1/2/3), die p38 Proteine (p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ / $\delta$ ) und Erk5 (27).

Wird der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert, wandelt die aktive PI3K das Plasmamembranlipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) um (26). Anschließend kann die Serin/Threonin-Kinase Akt an PIP<sub>3</sub> binden und durch *phosphoinositide-dependent kinase* 1 (PDK1) phosphoryliert und damit aktiviert werden (104).

Sowohl der MAPK-Signalweg, insbesondere die Erk1/2-Kaskade, als auch der PI3K/Akt-Signalweg sind an der Regulation der PMN-Apoptose, durch Modulation der Expression von Mitgliedern der Bcl-2-Familie, beteiligt (6, 52). Beide Signalwege können durch Zytokine, wie GM-CSF aktiviert werden und die Apoptose der PMN verzögern (40, 52, 95). Dies erfolgt über eine GM-CSF-vermittelte Stabilisierung des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 und einem damit verbundenen Konzentrationsanstieg des Proteins (40). Außerdem kann GM-CSF-vermitteltes aktiviertes Akt die proapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie inhibieren, indem es Bad und Bax phosphoryliert und somit deren Fähigkeit zur Heterodimerisierung mit den antiapoptotischen Proteinen Mcl-1 und Bcl-xL fördert (63, 95).

Einen weiteren Einfluss auf die Verzögerung des neutrophilen Zelltodes durch stabile Mcl-1-Spiegel hat die inhibitorische Phosphorylierung der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3), in Folge wachstumsfaktorenabhängiger PI3K/Akt-Aktivierung (39, 220).

Durch Wachstumsfaktoren-Entzug (IL-3) oder durch PI3K-Hemmung kann die aktive GSK-3 das Mcl-1 am Serin-159 phosphorylieren, was zur erhöhten Polyubiquitinylierung und zur proteasomalen Degradierung von Mcl-1 führt (125). Die Ergebnisse sind ein abnehmender Mcl-1-Proteinspiegel verbunden mit einer beschleunigten Apoptose. Ebenso führt die bei oxidativer Stress induzierte JNK-abhängige Phosphorylierung von Mcl-1 an Serin-121 und Threonin-163 zu dessen Inaktivierung und zur Erhöhung der PMN-Apoptoserate (87).

Große Unstimmigkeit herrscht in der Literatur über einen pro- oder doch eher antiapoptotischen Effekt der MAP-Kinase p38. So publizieren einige Autoren, dass

## Einleitung

p38 direkt die Caspase-8 und Caspase-3 inhibitorisch phosphorylieren kann und damit ein antiapoptotisches Potential besitzt (Alvarado-Kristensson et al., 2004). Nach dieser Auffassung führt eine Hemmung des p38-MAPK-Signalwegs zu einer verstärkten spontanen PMN-Apoptose (76, 107).

Andere Studien belegen wiederum ein proapoptotisches Potential der phosphorylierten und aktivierten MAPK p38 (4, 58, 64). Nach Derouet und Kollegen scheint diese p38-Aktivität mit der Mcl-1-Umsatzrate zu korrelieren. Somit kann die Aktivierung des p38-MAPK-Signalwegs den Mcl-1-Umsatz steigern und die PMN-Apoptose beschleunigen (41).

### 1.7 Die Akute-Phase-Reaktion und $\alpha$ -1-Antitrypsin (AAT)

Mikrobielle Invasion, Gewebeschädigung, immunologische Reaktionen und Entzündungsprozesse induzieren eine Konstellation von Wirtsantworten, die kollektiv als die Akute-Phase-Reaktion bezeichnet wird (45). Sie kann sowohl lokal als auch systemisch ausgelöst werden und ist durch Veränderungen der metabolischen, endokrinologischen, neurologischen und immunologischen Funktionen gekennzeichnet (165). Die Reaktionen des Körpers beinhalten vor allem Fieber, Leukozytose und die Produktion von Akute-Phase-Proteinen.

Immunkompetente Zellen, wie Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und PMN sezernieren Zytokine, unter anderem IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), Interferon- $\gamma$ , *epidermal growth factor* (EGF) und *leukocyte inhibitory factor* (LIF), die über die Blutbahn zur Leber gelangen und zusammen mit Cortisol die Produktion von über 30 verschiedenen Akute-Phase-Proteinen induzieren (10, 61). Die Akute-Phase-Proteine wurden definiert als Proteine, deren Plasmakonzentrationen im Rahmen einer Entzündung um mindestens 25 Prozent ansteigen (positive Akute-Phase-Proteine) oder abnehmen (negative Akute-Phase-Proteine) und gelten damit als wichtige diagnostische Marker in der labormedizinischen Entzündungsdiagnostik (130). Ein wichtiger Vertreter ist das C-reaktive Protein (CRP), aber auch AAT gewinnt zunehmend an Bedeutung vor allem in der Labordiagnostik der AAT-Mangel-Erkrankung (144).

## Einleitung

AAT gehört zur Serpin-Superfamilie und ist der häufigste zirkulierende Serinproteaseinhibitor im menschlichen Plasma (90). Die vorwiegende Synthese erfolgt in den Hepatozyten, aber auch PMN, Monozyten und Alveolarmakrophagen exprimieren AAT als Reaktion auf eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren (46, 96, 152). Als Akute-Phase-Protein steigt im Fall einer Entzündung oder Infektion der AAT-Spiegel (1,34 mg/ml) schnell auf das 3- bis 4-fache an (89). AAT hemmt primär die potentiell destruktive proteolytische Aktivität der Neutrophilen-Elastase, die PMN am Ort der Entzündung sezernieren (178).

Entfällt die Hemmung der Serinproteasen, wie bei der o.g. durch Gendefekt vererbten Erkrankung des hereditären AAT-Mangels, greift die Elastase das Bindegewebe an, vor allem das der Lunge aber auch der Leber mit folgeschweren Komplikationen. Das klinische Korrelat sind Lungenfunktionsstörungen ähnlich der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) bis hin zum Lungenemphysem sowie die Leberzirrhose (Parfrey et al., 2003).

Erhöhte AAT-Level haben in der Literatur sehr divergierende immunmodulatorische Funktionen, wie eine verminderte Synthese proinflammatorischer Zytokine, die Hemmung der PMN-Aktivierung und Chemotaxis sowie die Rolle als antiapoptotischer Faktor für Hepatozyten und vaskuläre glatte Muskelzellen (12, 67, 86, 90, 91, 117, 194, 200).

Harper et al. zeigten in einem Primaten-Sepsis-Modell, dass sich der septische Schock nach Gabe von hochdosiertem AAT verstärkte, und somit hohe AAT-Konzentrationen starke Immunreaktionen induzieren (75). Buyukates et al. publizierten einen starken Anstieg der Serum-AAT-Spiegel nach Bypass-Operationen (25). Ebenso finden sich erhöhte AAT-Level bei Patienten mit einem SIRS (71, 173).

Vor allem frühere Studien weisen auf entzündungshemmende und gewebeschützende Eigenschaften von AAT hin (90, 188). In einem Mausmodell des akuten Myokardinfarkts (AMI) verringert AAT die Caspase-1-Aktivität im ischämischen Myokard, was die Infarktgröße limitiert durch Erhaltung lebensfähiger Myozyten und einem nachteiligen kardialen *remodeling* vorbeugt (195). In einer Studie von 2014 zeigten Hurley et al., dass AAT die PMN-Apoptose über einen Mechanismus hochregulieren kann, der endoplasmatischen Retikulumstress und

## Einleitung

die Expression proapoptotischer Signale, einschließlich TNF- $\alpha$ , involviert (Hurley et al., 2014). Weitere Studien vermuten den Apoptose-hemmenden Effekt von AAT (in  $\beta$ -Zellen des Pankreas und in humanen aortalen vaskulären glatten Muskelzellen) in einer aufgehobenen Caspase-Aktivität, insbesondere der Caspase-3 (86, 219). Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend, beobachteten Petrache et al., eine direkte Hemmung der aktiven Caspase-3 durch AAT in primären pulmonalen Endothelzellen und in zellfreien Systemen, was zur Inhibierung der STS-induzierten Apoptose dieser führt (153). Eine kürzlich durchgeführte Studie zur molekularen Aufklärung der intrinsischen Apoptose-Resistenz in PMN konnte, unbeachtet der beteiligten Serumfaktoren, keine Assoziation zu einer reduzierten Caspase-3-Aktivität, sondern vielmehr zu einer erhöhten Akt-Aktivität und Mcl-1-Proteinstabilität nachweisen (Hornstein et al., 2016).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse legen nahe, dass die entscheidende Rolle des Akute-Phase-Proteins AAT, sowohl im Entzündungsprozess als auch im Überleben von PMN, noch nicht ausreichend verstanden wird und es einer weiteren Aufklärung bedarf.

## 1.8 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die molekularen Signalwege charakterisiert werden, die mit der AAT-vermittelten intrinsischen Apoptose-Resistenz in PMN im Zusammenhang stehen.

Obwohl einige Autoren übereinstimmend berichten, dass AAT den STS-induzierten Zelltod in PMN effizient inhibiert, muss die genaue Wirkungsweise noch geklärt werden. In einer früheren Studie, welche die Vorarbeit zu diesem Projekt liefert, wird beschrieben, dass das Serum von SIRS-Patienten die PMN vor einer intrinsischen Apoptoseinduktion schützt, durch Hemmung des Caspase- und Proteasom-abhängigen Abbaus des antiapoptotischen Mcl-1-Proteins (83). Es ist jedoch nicht klar, ob ein Zusammenhang zwischen den serumvermittelten Effekten auf die PMN und der AAT-modulierten Signalwege existiert.

Es wurden folgende Punkte untersucht:

1. Die Rolle von AAT bei der serumvermittelten (SIRS-Patienten-Serum) STS-Resistenz in PMN gesunder Probanden.
2. Die Wirkung von AAT auf die STS-vermittelte Modulation der PMN-Kinasesignalkaskaden PI3K/Akt und MAPK-Erk1/2.
3. Der Einfluss von AAT auf die Mcl-1-Proteinstabilität und die proteasomale Degradierung des antiapoptotischen Proteins.
4. Der AAT-Effekt auf die STS-abhängige Caspasen-Aktivierung.
5. Die Korrelation zwischen der intrinsischer Apoptose-Resistenz und der AAT-Genexpression in PMN gesunder Spender nach Serum-Behandlung von SIRS-Patienten.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen zum besseren Verständnis der Rolle von AAT in der Regulation der PMN-Apoptose beitragen. Sie sollen die AAT-vermittelte PMN-Apoptose-Resistenz bei schwer kranken Patienten, bspw. während eines SIRS beweisen, wodurch sich das Wissen über den PMN-Beitrag in der humanen Pathobiologie erweitert. Diese Kenntnisse erlauben es die Prozesse, welche für Remission oder Progression einer Entzündung essentiell sind, besser zu verstehen. Die Identifizierung der AAT-vermittelten Effekte auf die Signalkaskaden kann die

## Einleitung

Grundlage zur Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten schaffen, die zur Behandlung Neutrophilie-bedingter inflammatorischer Erkrankungen oder von SIRS und Sepsis notwendig sind.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Humanes Probenmaterial

##### Neutrophile Granulozyten aus Buffy-Coats

Die Grundlage aller Versuche bildete die Extraktion einer reinen Granulozyten-Population aus Buffy-Coats (Näheres 2.2.3). Es musste für die Experimente gewährleistet sein, dass die Zellen von gesunden Spendern stammen. Dafür wurden Buffy-Coats aus der Blutspendezentrale und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Köln verwendet. Die Nutzung der Blutprodukte im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln mit der Antragsnr. 15-393 genehmigt.

##### Patientenserien

Die für die folgenden Experimente verwendeten Patientenserien stammen von SIRS-Patienten und wurden für die Versuche freundlicherweise von der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die Studie wurde im Vorfeld durch die zuständige Ethikkommission (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) genehmigt (# 3412) (173).

#### 2.1.2 Geräte

Abzug	Clean Air Biohazard
Blotter	Invitrogen Novex® Semi-Dry Blotter
Brutschrank	Panasonic MCO-170AICUV-PE CO2 Incubator
Elektrophorese-System	BioRad Mini-PROTEAN® Tetra System
FACS	BD Biosciences FACSCalibur™
Geldokumentationsanlage	BioRad ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software

## Material und Methoden

Heizblock	VWR Digital Headblock
Magnetrührer	IKAMAG® RH
Mikroskop	Olympus CKX31
Multi-Achs-Rotations-Mischer	CAT RM 5
Multikanalpipette	BRAND® Transferpette® S -8
Multiplattenlesegerät	Perkin Elmer VICTOR™ X3
NanoDrop Spectralphotometer	Thermo Scientific NanoDrop 2000c Spectralphotometer
PCR-Gerät	Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System
pH-Meter	METTLER TOLEDO
Pipettboy	BRAND accu-jet® pro
	IBS Integra Biosciences Pipetboy acu
Pipetten	Eppendorf Research® 0,1 – 2,5 µl
	Eppendorf Research® 0,5 – 10 µl
	Eppendorf Research® 2 – 20 µl
	Eppendorf Research® 10 – 100 µl
	Eppendorf Research® 100 – 1000 µl
Power Supply	BioRad Power Pac HC
Schüttler	GFL 3006
Sterilbank/Sicherheitswerkbank	KOJAIR® Biowizard
Thermal Cycler	Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler
Ultraschallprozessor	Hielscher UP50H
Vortex	VWR Analog Vortex Mixer
Waage	Fisher Scientific SG-2001
Wasserbad	memmert WNB
Zählkammer Neubauer	LO - Laboroptik Ltd
Zentrifugen	BECKMAN COULTER Microfuge® 16
	BECKMAN COULTER Microfuge® 22R
	BECKMAN COULTER Allegra® X-15R
	Labnet MPS 1000 Mini plate spinner

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Zubehör

0,2 ml Reaktionsgefäße	SARSTEDT Multiply-Pro Gefäß
0,5 ml Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH Multi®-Safe Seal® Tubes
1,5 ml Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH Multi®-Safe Seal® Tubes
2,0 ml Reaktionsgefäße	SARSTEDT SafeSeal micro tube
5 ml Rundbodenröhrchen (FACS)	FALCON® Polystyrene Round-Bottom Tube
15 ml Falcons	SARSTEDT Tube 15ml
50 ml Falcons	SARSTEDT Tube 50ml
24-Well Platten	FALCON® Multiwell 24
48-Well Platten	FALCON® Multiwell 48
96-Well Platten	FALCON® Multiwell 96
	Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™ 96-Well Microplates
	Applied Biosystems™ MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL
Pasteurpipetten Plastik	VWR 7 ml 612-1681
5 ml Stripetten	SARSTEDT Serological Pipette
10 ml Stripetten	SARSTEDT Serological Pipette
25 ml Stripetten	SARSTEDT Serological Pipette
Western Blotting Membran	peqGOLD Nitrocellulose Membran
Western Blotting Filterpapier (2,5 mm; 7,5 x 8,4 cm)	Invitrogen™ Blotting Filter Paper LC2010

### 2.1.4 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH 4227
2-Propanol	Carl Roth GmbH 6752
Acrylamid	Carl Roth GmbH Rotiphorese® Gel 30
α-1-Antitrypsin from human plasma	Sigma A9024
Ammonium persulfate (APS)	Sigma A3678
Ammoniumchlorid	Sigma A9434

## Material und Methoden

Brefeldin A	Cayman Chemicals Item № 11861
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth GmbH A512
BSA	PAA Bovine Serum Albumin pH 7.0
Chloroform	Carl Roth GmbH Trichlormethan/Chloroform 6340
Easycoll Separating Solution	Biochrom GmbH L 6145 Dichte 1.124 g/ml
EDTA	Carl Roth GmbH 8043
Ethanol	Carl Roth GmbH 9065
FCS	PAN-Biotech Fetal Bovine Serum Premium P30-3301
Glycerol	Carl Roth GmbH 3783
Glycin	Carl Roth GmbH 3908
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth GmbH P748
Methanol	Carl Roth GmbH 4627
Milchpulver	Carl Roth GmbH Milchpulver T145.2
Natriumchlorid (NaCl) 0,9 %	Fresenius NaCl 0,9 % Infusionslösung
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH Mono-Natriumcitrat HN13
Natriumdesoxycholat	Carl Roth GmbH 3484
Nonidet™ P 40 Substitute (NP-40)	Sigma 74385
PBS	gibco® DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
Penicillin / Streptomycin	Sigma P4333
Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Cell Signaling 5870
Ponceau S	SERVA 33437
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems™ 4367659
Propidium iodide	Sigma P4170
Protease Inhibitor Cocktail (100X)	Cell Signaling 5871
Protein G Plus/Protein A Agarose Suspension	Calbiochem® IP05
RPMI 1640 Medium with stable glutamine	Biochrom GmbH FG1215
SDS	Sigma L3771

## Material und Methoden

Staurosporin	Enzo Staurosporine ALX-380-014-C250
TEMED	Carl Roth GmbH TEMED
Tris	Carl Roth GmbH TRIS PUFFERAN® AE15.1
Tris-Base	Calbiochem® 648310
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCL)	Calbiochem® 648317
Triton™ X-100	Sigma T8787
Trizol	Thermo Scientific™ TRIzol™ Reagent 15596026
Trypan blue stain (0,4%)	Gibco™ 15250061
Tween 20	Sigma P9416
Wasser, DNase-, RNase-frei	Invitrogen UltraPure™ DNase/RNase- Free Distilled Water 10977023

### 2.1.5 Kits

Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega™ G8090
Caspase-Glo® 9 Assay	Promega™ G8210
DNA-free™ Kit	Ambion™ AM1906
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems™ 4368814
Human Alpha 1-Antitrypsin ELISA Kit	GenWay Biotech GWB-5428A0
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific™ 23225
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific™ 32209
Roti®-Mark WESTERN-Set	Carl Roth GmbH 0947
UptiLight HRP Blot Chemiluminescent ECL Substrate	INTERCHIM UPTIMA 99619A

### 2.1.6 Genspezifische Primer

Genspezifische Primer für Real-Time-PCR, Sigma

hu18S - <i>forward</i>	5' - CATGGTGACCACGGGTGAC - 3'
hu18S - <i>reverse</i>	5' - TTCCTTGGATGTGGTAGCCG - 3'
huAAT - <i>forward</i>	5' - ATGCTGCCCAGAAGACAGATA - 3'

## Material und Methoden

huAAT - reverse	5' - CTGAAGGCGAACTCAGCCA - 3'
-----------------	-------------------------------

### 2.1.7 Antikörper

#### Primärantikörper

Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb	Cell Signaling #4691
Anti-alpha 1 Antitrypsin Antibody	Abcam ab207303
Anti-Mcl-1 (phospho S159) Antibody	Abcam ab111574
GAPDH Antibody (13H12)	NOVUS BIOLOGICALS NBP2-27103
Mcl-1 (D35A5) Rabbit mAb	Cell Signaling #5453
p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody	Cell Signaling #9102
Phospho-Akt (Ser473) Antibody	Cell Signaling #9271
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody	Cell Signaling #9101

#### Sekundärantikörper

Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Dako P0447
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako P0448

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

#### Zellkulturmedium

500 ml RPMI

5 ml P/S (Penicillin / Streptomycin)

#### Lysis Solution (1000 ml)

8,3 g Ammoniumchlorid

1 g KHCO<sub>3</sub>

0,04 g EDTA

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

#### 1% Natriumcitrat-Lösung

1g Natriumcitrat

## Material und Methoden

ad 100 ml H<sub>2</sub>O

### **Hypotonische Propidiumiodid (PI)-Lösung (Nicoletti-Puffer)**

0,1 % Natriumcitrat

0,1 % Triton X-100

50 µg/ml Propidium iodide

### **Ripa-Puffer**

50 mM Tris HCl, pH 8.0

150 mM NaCl

1 % NP-40

0.5 % Natriumdesoxycholat

0.1 % SDS

Vor Gebrauch wurden dem Puffer noch Phosphataseinhibitor und Proteininhibitor (1:100) zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **Laemmli- Puffer**

4x Tris-Glycin-SDS Sample Buffer

2,5 ml Tris-HCL (pH 6,8) (Konzentration: 252 mM)

4 ml Glycerol (Konzentration: 40 %)

0,8 g SDS (Konzentration: 8 %)

1 µg Bromphenolblau (Konzentration: 0,01 %)

ad 10 ml H<sub>2</sub>O

Vor Gebrauch wurden dem Laemmli-Puffer noch 20 % 2-Mercaptoethanol zugesetzt.

## **Western Blot**

### **Laufpuffer**

für 10x Laufpuffer

30,3 g Tris (pH 8,3 - 8,8) (Konzentration in 1x Laufpuffer: 25 mM)

144,2 g Glycin (Konzentration in 1x Laufpuffer: 192 mM)

## Material und Methoden

10g SDS (Konzentration in 1x Laufpuffer: 0,1 %)  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

für 1x Laufpuffer

10x Laufpuffer 1:10 in Aqua dest.

### **Tris-Glycin Transferpuffer**

für 25x Transferpuffer

18,2 g Tris-Base (Konzentration in 1x Transferpuffer: 12 mM)

90 g Glycin (Konzentration in 1x Transferpuffer: 96 mM)

ad 500 ml H<sub>2</sub>O

### **Blotting-Puffer (2x Tris-Glycin Transferpuffer)**

60 ml 25x Transferpuffer

75 ml Methanol

ad 750 ml H<sub>2</sub>O

### **4x Trenngelpuffer**

91 g Tris (pH 8,8) (Konzentration: 1,5 M)

2 g SDS (Konzentration: 0,4 %)

ad 500 ml H<sub>2</sub>O

### **4x Sammelgelpuffer**

6,05 g Tris (pH 6,8) (Konzentration: 0,5 M)

0,4 g SDS (Konzentration: 0,4 %)

ad 100 ml H<sub>2</sub>O

### **TBS**

für 10x Puffer

12,1 g Tris (pH 7,5) (Konzentration in 1x TBS: 7,7 mM)

87,7 g NaCl (Konzentration in 1x TBS: 150 mM)

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

für 1x TBS

## Material und Methoden

10x TBS 1:10 in Aqua dest.

### **TBS-T**

100 ml 10x TBS

1 ml Tween (Konzentration in 1x TBS-T: 0,1%)

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

### **Blocking Buffer**

5 % Milchpulver in 1x TBS-T

3 % Milchpulver in 1x TBS-T

5 % BSA in 1x TBS-T

3 % BSA in 1x TBS-T

### **Trenngel 10 % (für 1 Gel):**

3,125 ml H<sub>2</sub>O

2,5 ml 30 % Acrylamid

1,875 ml 4x Trenngelpuffer

10 µl TEMED

25 µl 10 % APS

### **Sammelgel (1 Gel):**

3 ml H<sub>2</sub>O

650 µl 30 % Acrylamid

1,25 ml 4x Sammelgelpuffer

10 µl TEMED

25 µl 10 % APS

### **Stripping-Puffer**

3,75 g Tris (pH 6,8) (Konzentration: 62,5 mM)

10 g SDS (Konzentration: 2 %)

ad 500 ml H<sub>2</sub>O

Vor Gebrauch wurden dem Stripping-Puffer noch 100 mM 2-Mercaptoethanol zugesetzt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 $\alpha$ -1-Antitrypsin (AAT) - Immunodepletion aus Patientenseren

Um den Einfluss von AAT im Serum von SIRS-Patienten auf die PMN gesunder Spender genauer untersuchen zu können, wurde eine Immunodepletion durchgeführt.

Dazu wurde vorab ein Pool aus den zur Verfügung gestellten SIRS-Patientenseren (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) des 1. postoperativen (p.o.) Tages 5 verschiedener Patienten gebildet.

300  $\mu$ l Serumpool wurden mit 20  $\mu$ l Protein G Plus/Protein A Agarose Beads versetzt. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei 4°C auf dem Multi-Achs-Rotations-Mischer wurde die Probe mit 14.000 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. In der so entstandenen *Preclearance* wurde jetzt die Proteinkonzentration bestimmt, um sie im weiteren Verlauf der Experimente auf 3 mg/ml einzustellen.

Um möglichst viel AAT aus der *Preclearance* zu depletieren, wurde nach dem Prinzip der Immunpräzipitation gearbeitet. Dazu wurden zuerst die Beads (15  $\mu$ l Beads/ $\mu$ g Antikörper) mit einem spezifischen anti-AAT Antikörper (Konzentration 0,184 mg/ml; monoklonal aus Kaninchen; abcam) für 4 h bei 4°C auf dem Multi-Achs-Rotations-Mischer inkubiert. Anschließend wurde der vorgereinigte Serumpool im Verhältnis 1:50 ergänzt. Nach weiteren 12 h Inkubationszeit wurde das Antigen-Antikörper-Bead-Gemisch mit 14.000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand sorgfältig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung der AAT-Konzentration und Quantifizierung der Depletion folgte ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).

### 2.2.2 AAT-Konzentrationsbestimmung mittels ELISA

Beim ELISA handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren bei dem das Antigen durch einen enzymgekoppelten Antikörper gebunden und in Folge eines Substratumsatzes mit enzymatischen Farbumschlag detektiert wird. Dabei

## Material und Methoden

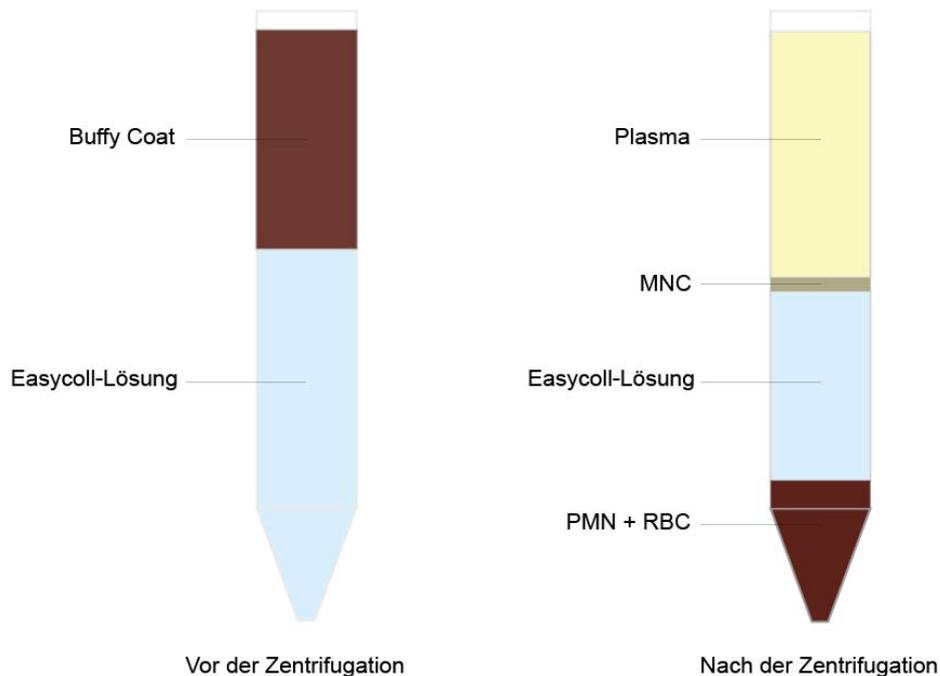
korreliert die Intensität des Farbumschlags mit der Menge des nachzuweisenden Antigens. Es gibt verschiedene Herangehensweisen des Immunassays.

Um die AAT-Konzentration in dem depletierten Patientenpoolserum zu messen, wurde das Human Alpha 1-Antitrypsin ELISA Kit (GenWay) verwendet. Dieses arbeitet auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA, bei dem das gesuchte Antigen AAT zwischen einem 1. stationären, auf der Mikrotiterplatte fixierten und einem 2. enzymmarkiertem Antikörper gebunden wird. Beim 1. Antikörper handelt es sich um anti-human-AAT und beim 2. Antikörper um anti-human-AAT mit dem gekoppelten Enzym Peroxidase.

Als Verdünnungsfaktor für die Proben wurde 1:40.000 gewählt. Für alle weiteren Arbeitsschritte wurde exakt nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Die abschließende Absorptionsmessung bei 450 nm erfolgte am Multiplattenlesegerät Perkin Elmer VICTOR™ X3. Aus den Absorptionswerten der Standardkurve und der Proben konnten die Konzentrationen anschließend errechnet werden.

### **2.2.3 Herstellung einer reinen Granulozyten-Population aus Buffy Coats**

Humane PMN wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Buffy Coats isoliert. Zur Herstellung einer reinen Granulozyten-Population muss die Zieldichte des Dichtegradienten auf 1,086 g/ml eingestellt werden. Dazu wurden in einem 15 ml Falcon 5 ml Easycoll Separating Solution (Dichte 1,124 g/ml) und 3,4 ml physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gemischt. Anschließend wurden behutsam 5 ml des Buffy Coats darüber geschichtet, so dass 2 Phasen entstanden (siehe Abb. 2.1 links). Durch die folgende Zentrifugation bei 840 x g für 30 min bei 17°C ohne Bremse wurden die Bestandteile ihrer Dichte entsprechend von oben leicht nach unten schwer aufgetrennt. Durch sanftes Auslaufen der Zentrifuge stellte sich die Schichtung im Falcon nun wie in Abb. 2.1 rechts gezeigt dar.



**Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Komponentenverteilung vor (links) und nach (rechts) der Dichtegradientenzentrifugation**

Im linken Falcon werden ca. 6,6 ml des Buffy Coat über 8,4 ml des Dichtegradienten, bestehend aus 5 ml Easycoll Separating Solution und 3,4 ml 0,9 % NaCl, geschichtet.

Im rechten Falcon sieht man die klare Trennung der Blutbestandteile nach der Zentrifugation (30 min, 840 x g ohne Bremse, 17°C). Von oben leicht nach unten schwer sind dies: Plasma; *mononuclear cells* (mononukleäre Zellen, MNC) bspw. Monozyten, Lymphozyten, Makrophagen; Easycoll-Lösung; neutrophile Granulozyten (PMN) und *red blood cells* (Erythrozyten, RBC) im Zellpellet.

Die oberen Schichten (Plasma, Mononukleäre Zellen, Easycoll Separating Solution) wurden bis kurz oberhalb des entstandenen Granulozyten-Erythrozyten-Pellet abpipettiert und verworfen. Um die Granulozyten zu separieren, müssen die Erythrozyten im Pellet lysiert werden. Dazu wurde das Pellet vorsichtig mit einer Pasteurpipette in Lysis Solution resuspendiert, in ein 50 ml Falcon überführt und auf ein Gesamtvolumen von 50 ml gefüllt. Nach 7-minütiger Lagerung auf Eis zeigte sich durch die lysierten Erythrozyten ein Umschlag der Lösung von trüb dunkelrot zu klar leuchtend rot. Sobald diese Veränderung der Lösung beobachtet werden konnte, folgte ein nächster Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm für 5 min bei 17 °C. Die nun über dem Pellet liegende Lysis Solution wurde dekantiert und das neue, zum größten Teil aus Granulozyten bestehende Zellpellet in zwei Wiederholungsschritten von den verbliebenen Erythrozytenresten mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) gewaschen.

Anschließend wurde das Granulozyten-Pellet in PBS resuspendiert und kurzzeitig, bis zur weiteren Verwendung in der Zellkultur, auf Eis gelagert.

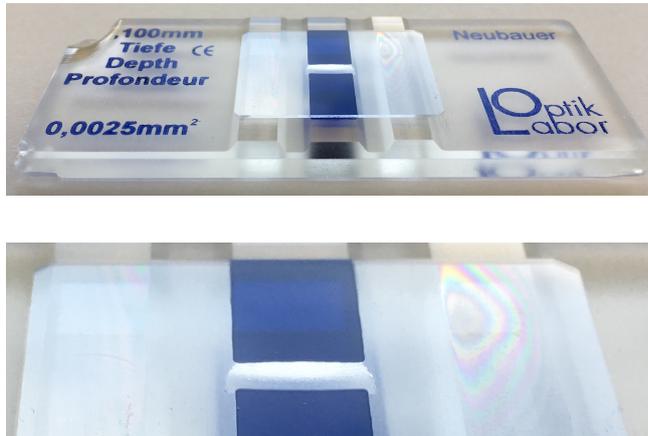
### **2.2.4 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-*improved*-Zählkammer**

Die manuelle Zellzählung ist eine visuelle Methode unter Zuhilfenahme einer Zählkammer und des Lichtmikroskops. Es gibt eine Vielzahl an verschiedenen Zählkammern, die sich im Design der Kammer und der Art der Zählung unterscheiden, jedoch bleibt das grundsätzliche Funktionsprinzip gleich.

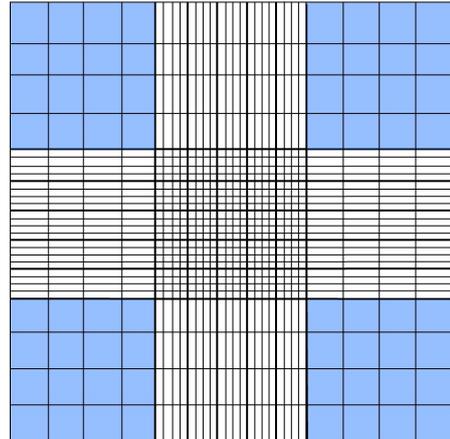
Es gibt die Grundplatte, ähnlich einem Objektglasträger, und ein Deckglas. Die Grundplatte ist mittels Schliff und Politur zentral so bearbeitet, dass zwischen ihr und dem Deckglas ein Raum mit definiertem Volumen entsteht. Um dabei Ungenauigkeiten zu vermeiden, werden dickere Deckgläser als üblich verwendet, die ein mögliches Durchbiegen aufgrund der Kapillarkräfte verhindern sollen. Zur Kontrolle des korrekten Sitzes muss auf die Ausbildung der *Newtonschen*-Ringe an den seitlichen Rändern des Deckglases geachtet werden (Abb. 2.2a unten). Dabei handelt es sich um farbige, konzentrische Ringe welche an den Grenzflächen durch Interferenzen des sichtbaren Lichts entstehen, sobald das Deckglas in der korrekten Position sitzt.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauer-*improved*-Zählkammer (Abb. 2.2a). Diese ist, wie in der Abb. 2.2b schematisch dargestellt, durch eingravierte Linien in 3x3 gleichgroße Quadrate unterteilt und mit Ausnahme des Zentralquadrats (5x5), ist jedes Quadrat noch einmal in 4x4 kleinere Quadrate unterteilt.

**a**



**b**



**Abbildung 2.2 Neubauer-improved-Zählkammer**

**2a: Foto (makroskopisch)**

Oben: gesamte Zählkammer

Unten: Detailausschnitt zur Darstellung der *Newtonschen-Ringe*

Zum besseren Verständnis sind in den gezeigten Fotos die obere und untere Kammer mit Trypanblau gefärbt.

**2b: schematische Darstellung (mikroskopisch)**

Aufbau des Zählfeldes der Neubauer-improved-Zählkammer. Die auszuzählenden Eckquadrate sind hier blau markiert.

Ausgezählt wurden je 16 Kästchen der 4 Eckquadrate. Daraus wurde dann die mittlere Zellzahl eines Eckquadrates errechnet. Da ein Eckquadrat eine Kantenlänge von 1 mm und eine Kammerhöhe von 0,1 mm hat, vorausgesetzt das Deckglas befindet sich in korrekter Position, entsteht ein definiertes Volumen von  $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ } \mu\text{l}$  (155). Durch Multiplikation des Mittelwerts mit dem Verdünnungsfaktor und dem Umrechnungsfaktor  $10^4$ , ergibt sich die Zellzahl/ml, entsprechend dieser Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert Zellzahl pro Eckquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Umrechnungsfaktor } 10^4$$

Im Vorfeld der eben beschriebenen Zellauszählung wurde die PMN-Zellsuspension im Verhältnis 4:1 mit dem anionischen Diazofarbstoff Trypanblau verdünnt. Dies dient der Markierung avitaler Zellen, da Trypanblau intakte Zellmembranen nicht passieren kann und somit die Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen im Lichtmikroskop ermöglicht.

### 2.2.5 Zellkultur

Nach erfolgter Zellzahlbestimmung konnte nun das jeweils erforderliche Volumen der, wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben, kurzfristig auf Eis gelagerten PMN-Zellsuspension zentrifugiert (1500 rpm für 5 min bei 17 °C) werden. Das Zellpellet wurde anschließend in Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 1% P/S resuspendiert und dadurch auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

Für einen Teil der Experimente erfolgte die PMN-Kultivierung pro Versuchsansatz als Triplett mit jeweils 500 µl in 48-Well-Platten mittels drei verschiedener Seren in 1%iger Konzentration. Dies waren der auf 3 mg/ml eingestellte Patientenpool, AAT-depletiertes Patientenserum und *fetal calf serum* (FCS) als Kontrollgruppe zur späteren Apoptosemessung. In einigen Experimenten wurde der mit AAT-depletierten Patientenserum behandelte Zellkultur noch natives Plasma-AAT (2mg/ml; Sigma A9024) hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank wurden der Hälfte des Versuchsansatzes 0,2 µM STS zugesetzt und für weitere 3 h (Western Blot), 4 h (Caspase-Assay) und 18 h (Apoptosemessung) inkubiert.

Für die späteren Western Blots wurden jeweils 1000 µl und für die Caspase-Assays jeweils 250 µl der Zellkultur in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation (1500 rpm für 5 min bei 17 °C) wurde der Überstand entfernt und die Zellen konnten bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren werden.

Nach 18 h konnten die verbliebenen 250 µl der Zellkultur geerntet und für die anschließende Apoptosemessung vorbereitet werden.

Ein anderer Teil der Experimente erforderte die PMN-Kultivierung mit Brefeldin A (BFA) (3 µg/ml), einem Inhibitor des intrazellulären Proteintransports. Dabei erfolgen die Versuchsansätze in 24-Well-Platten als Dupletts mit jeweils 1500 µl, welche mit 1%igem unverdünntem Patientenpoolserum und FCS behandelt wurden. Nach einstündiger Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank startete die Gesamtinkubationszeit von 18 h durch Zugabe von 0,2 µM STS. 4 h vor Ablauf der Inkubationszeit wurde BFA hinzugefügt. Die Kultivierung endete mit der Zellernte durch Überführung des jeweiligen Volumens pro Well in 1,5 ml frische Reaktionsgefäße. Nach Zentrifugation (1500 rpm für 5 min bei 17 °C) und Entfernung des Überstands, konnten die Zellpellets bei -80 °C eingefroren werden.

### 2.2.6 Apoptosequantifizierung mittels Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte mit einem einfachen und schnell durchführbaren Durchflusszytometrieverfahren, unter Verwendung einer hypotonen Propidiumiodid (PI)-Lösung. Diese Methode wurde 1991 erstmals von Nicoletti und Kollegen zur Untersuchung der Apoptose an Maus-Thymozyten beschrieben und findet mittlerweile weitverbreitete Anwendung in verschiedensten experimentellen Modellen und Zelllinien (140, 168).

In der apoptotischen Zelle treten typische morphologische Veränderungen und ausgedehnte DNA-Fragmentierungen mit Verlust des nuklearen DNA-Gehalts auf, was sich diese Methode zu nutze macht. PI dient dabei im weitesten Sinne der Kernfärbung, indem es als fluorogene Verbindung stöchiometrisch an Nukleinsäuren bindet, sodass die zu messende Fluoreszenzemission proportional zum DNA-Gehalt in der Zelle ist (163, 202).

Ein weiterer Bestandteil des hypotonen Nicoletti-Puffers ist Triton X-100, ein nichtionisches Tensid, welches Membranproteine aus ihren Konformationen löst. In Folge dessen wird die Zellmembran lysiert, nicht aber die Kernmembran. Die intakten Zellkerne können aus den Zellen treten und ihr DNA-Gehalt kann im Durchflusszytometer gemessen und anschließend analysiert werden. Dabei zeigt sich ein breiter hypodiploider (sub-G<sub>1</sub>) Peak, der leicht von dem schmalen Peak der intakten Zellen mit normalen DNA-Gehalt unterschieden werden kann (Riccardi et al., 2006).

Zur Apoptosemessung wurden die frisch kultivierten PMN (2.2.5) in 5 ml Rundbodenröhrchen überführt, abzentrifugiert (1500 rpm für 5 min bei 17 °C) und anschließend das Zellpellet in 300 µl hypotoner PI-Lösung resuspendiert. Nach 2 h Inkubation bei 4°C im Dunkeln erfolgte die Durchflusszytometrie. Pro Probe wurden 10.000 Zellen gemessen. Die Datenanalyse erfolgte mittels Cell Quest Software (BD). Um das Ausmaß der Apoptose zu erfassen, wurde der prozentuale Anteil des hypodiploiden (sub-G<sub>1</sub>) Peak in der Probe bestimmt.

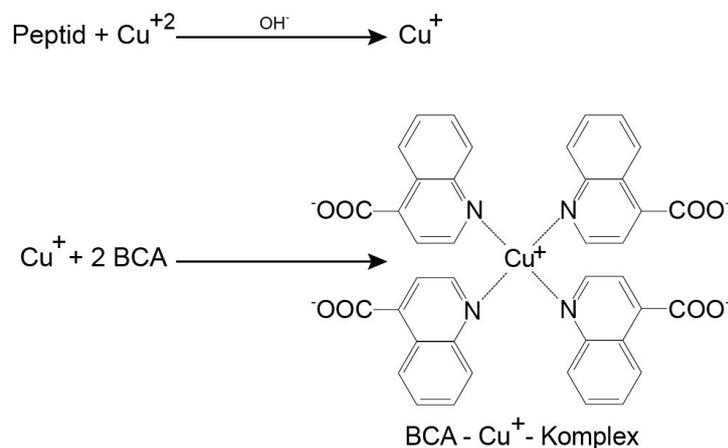
## 2.2.7 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.7.1 Proteinisolierung und -Konzentrationsbestimmung

Zur Proteinisolierung wurden die kultivierten und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Zellen in RIPA-Puffer aufgenommen und mittels Ultraschallprozessor sonifiziert (Sonotrode MS1, Amplitude 80 %, 0,5 Zyklen).

Die unmittelbar folgende quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung wurde nach Herstellerangaben mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Diese Methode kombiniert die Protein-induzierte Biuret-Reaktion mit dem Detektionssystem des hochempfindlichen und selektiven kolorimetrischen Nachweises des  $\text{Cu}^+$  durch Bicinchoninsäure (BCA).

Im ersten Schritt findet die Biuret-Reaktion statt, bei der die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  resultiert, durch Bildung eines hellblauen Chelat-Komplexes von Peptiden, mit mindestens drei Aminosäureresten, und  $\text{Cu}^{2+}$  in einem alkalischen Milieu. Im zweiten Schritt reagiert das reduzierte  $\text{Cu}^+$  mit zwei Molekülen BCA zu einem Chelat unter Ausbildung einer intensiven lila Färbung (Abb. 2.3). Dieser neu entstandene Komplex ist wasserlöslich und weist mit zunehmender Proteinkonzentration eine starke lineare Absorption bei 562 nm auf (Smith et al., 1985).



**Abbildung 2.3** Ausbildung des intensiv lila gefärbten  $\text{BCA-Cu}^+$ -Chelatkomplex

In der oberen Zeile ist die klassische Biuret-Reaktion gezeigt. Peptide und  $\text{Cu}^{2+}$  reagieren in alkalischer Umgebung miteinander, unter Reduktion des Kupfer-Ions. Dieses bildet, in der unteren Zeile dargestellt, mit 2 Molekülen BCA einen intensiven lilafarbenen Chelatkomplex aus.

Wie dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen ist, mussten zu Beginn der Proteinkonzentrationsbestimmung, eine Verdünnungsreihe als Protein-Standard

## Material und Methoden

aus Albumin 2 mg/ml (BSA) und die Arbeitsreagenz *BCA working reagent* angefertigt werden.

Vor der Messung wurden die sonifizierten Proben im Verhältnis 1:6 mit PBS verdünnt. Anschließend wurden je 10 µl des Proteinstandards (µg/µl: 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; 0,025; 0) und der verdünnten Proben als Dupletts in eine 96-Well-Platte pipettiert und je 200 µl *BCA working reagent* hinzugegeben. Nach kurzer Durchmischung wurde die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Extinktion bei 562 nm wurde mit dem Multiplattenlesegerät Perkin Elmer VICTOR™ X3, nach Abkühlung der Platte auf Raumtemperatur (RT), gemessen.

Die in RIPA-Puffer aufgenommene Probe konnte jetzt der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zugeführt werden oder bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert werden.

### 2.2.7.2 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteinen durch Auftrennung eines Proteingemisches nach der Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Die diskontinuierliche SDS-PAGE unter denaturierten Bedingungen wurde von U. K. Laemmli erstmals 1970 beschrieben und verwendet unterschiedliche Puffer im Sammel- und Trenngel auf Polyacrylamidbasis, welches als eine Art Sieb fungiert (102).

Vor der Elektrophorese, mussten die Proben entsprechend aufbereitet werden. Dazu wurde dem Proteingemisch im Verhältnis 4:1 mercaptoethanolhaltiger Laemmli-Puffer zugesetzt und anschließend für 7 min bei 95°C erhitzt. Das im Laemmli-Puffer enthaltene stark anionische Tensid SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine und bildet negativ geladene Komplexe. Die gebundene Menge an SDS und damit auch die Ladung auf dem Komplex ist proportional zur Proteingröße (ca. 1,4 g SDS auf 1 g Protein) (182). Somit ist gewährleistet, dass die Proteine im elektrischen Feld ungestört in Richtung Anode laufen und nur entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden.

Zudem werden durch die Hitzeeinwirkung (Denaturierung), durch Bindung von SDS (negative Abstoßung) und durch Einsatz von Mercaptoethanol (Reduktion) die ursprünglichen Proteinstrukturen zerstört und es bilden sich lange Proteinketten aus. Dabei verhalten sich Länge der Kette und Molekülmasse proportional zueinander.

## Material und Methoden

Nach Füllung der inneren und äußeren Kammer des Elektrophoresesystems mit einem SDS-haltigen TRIS-Glycin-Laufpuffer, wurde das Gel beladen. Die erste Spur wurde immer mit 5 µl eines Molekulargewichtsmarkers (Roti<sup>®</sup>-Mark WESTERN-Set), der als vergleichender Größenstandard diente, und die verbliebenen Geltaschen mit je 24 µl der aufbereiteten Proben beladen. Standardgemäß wurden 20 - 40 µg des Gesamtproteins mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Nach kurzer Fokussierung der Proteine in einem 5%igen Sammelgel (pH 6,8) bei 60 V, erfolgte die Auftrennung in Proteinbanden in einem 10%igen kleiner porigen Trenngel (pH 8,8) bei 120 V.

### 2.2.7.3 Western Blot

Im direkten Anschluss an die SDS-PAGE erfolgte die Übertragung der Proteinbanden auf eine Nitrozellulose-Trägermembran mittels Elektrophorese im *Semidry-Blot*-Verfahren. Das elektrische Feld wird im Gegensatz zur SDS-PAGE senkrecht zum Gel und der darunter liegenden Trägermembran angelegt, wodurch die negativ geladenen SDS-beladenen Proteine bei ihrer Wanderung in Richtung Anode übertragen werden (68).

Zunächst wurden die Gele, die Filterpapiere und die Nitrozellulose-Membranen kurz in Blotting-Puffer äquilibriert. Danach wurde der Transfer als „Sandwich“ im Blotter aufgebaut. Auf die Anoden-Platte (unten) wurden pro Gel zwei Filterpapiere gelegt, darauf kam die Membran mit dem blasenfrei aufgelegten Gel, darüber wieder zwei Filterpapiere und zum Abschluss die Kathoden-Platte (Deckel). Pro Proteintransfer fanden bis zu 4 Gele Platz im Blotter. Es musste darauf geachtet werden, dass zwischen den „Sandwiches“ keine Verbindung durch den Blotting-Puffer entstand. Die Transferzeit betrug 2,5 h bei 24 V.

Um die Effizienz des Proteintransfers zu kontrollieren, wurden die Membranen temporär mit dem reversiblen roten Azofarbstoff Ponceau S gefärbt und anschließend wieder mit TBS-T entfärbt.

Vor Immundetektion wurden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran, mit einem für den späteren Antikörper nicht sichtbaren Protein, blockiert. Dies verhindert das Anhaften unerwünschter Proteine und somit störende Verfärbungen in der folgenden Antikörperfärbung. Dazu wurden die Membranen für

## Material und Methoden

1 h bei RT, mit dem laut Herstellerprotokoll jeweils empfohlenen Blocking-Buffer (BSA oder Milchpulver in TBS-T), inkubiert. Ebenso richteten sich die Verdünnungen und Inkubationszeiten bei der Anwendung des jeweiligen Primärantikörpers nach den Vorgaben des Herstellers. Vor und nach Primärantikörperbehandlung erfolgte jeweils ein 5-minütiger Waschschrift mit TBS-T in 3 Wiederholungen.

Es folgte die Inkubation (1h, RT, dunkel) mit einem mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugiertem Sekundärantikörper. Nach 5-minütigem Waschschrift in TBS-T (3 Wiederholungen), erlaubte das entstandene Enzym-gekoppelte Immunkonjugat, den indirekten Nachweis des Proteins durch Katalyse von Luminol in seine oxidierte Form mit Hilfe des Kits (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate). Diese Chemilumineszenzreaktion konnte in der Geldokumentationsanlage mit dem ChemiDoc XRS Programm (Bio-Rad) visualisiert und detektiert werden. Dabei entspricht die Lumineszenzintensität dem relativen Proteingehalt einer Bande. Zur Quantifizierung der relativen Proteinmenge einer Membran wurden die Banden markiert und densitometrisch mit Hilfe der Image Lab™ Software 6.0 (Bio-Rad) ausgewertet.

### **2.2.7.4 „Stripping“ der Western Blots**

Das aus dem Englischen übernommene Wort *stripping* (abstreifen), beschreibt die Entfernung von Primär- und Sekundärantikörpern von der Nitrozellulosemembran, unter Erhalt des nachzuweisenden Antigens, wodurch eine Wiederverwendung des Western Blots möglich wird.

Zum *stripping* wurde die Membran in einen, zu Beginn frisch zubereiteten, mercaptoethanol-haltigen Strippingpuffers gelegt und für 10 min bei 60°C im Wasserbad geschüttelt. Danach erfolgte dreimal ein 5-minütiger Waschschrift in PBS und für weitere 5 min in TBS-T. Anschließend konnte die Membran erneut, wie unter Punkt 2.2.7.3 beschrieben, geblockt, mit einem weiteren Primär- und Sekundärantikörper inkubiert und abschließend quantifiziert werden.

### **2.2.8 Caspase-Aktivitäts-Assay**

Die Caspasen-3, -7 und -9 sind Mitglieder der Cystein-Asparaginsäure-spezifischen Protease-Familie, die eine tragende Rolle bei der Apoptose spielen. Ihren Namen verdanken sie der Eigenschaft, dass sie ihre Zielproteine am C-terminalen Ende

## Material und Methoden

von Aspartat spalten. Dies macht sich der lumineszierende Caspase-Glo<sup>®</sup>-Assay (Promega) zu nutze, indem er ein prolumineszentes Substrat (Aminoluciferin) liefert, an das beim Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 -Assay die Tetrapeptidsequenz Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat (DEVD) und beim Caspase-Glo<sup>®</sup> 9 -Assay die Tetrapeptidsequenz Leucin-Glutamat-Histidin-Aspartat (LEHD) angehängt ist. Nach der Caspasenspaltung wird Aminoluciferin frei und dient dem Enzym Luciferase als Substrat, was zur Erzeugung eines messbaren Lumineszenzsignals führt (Liu et al., 2004). Dabei korreliert die Signalstärke mit der Caspasenaktivität.

Zur Caspasen-Aktivitätsmessung wurden die kultivierten und eingefrorenen PMN-Proben in 30 µl PBS aufgenommen und der Proteinisolierung und -Konzentrationsbestimmung (2.2.7.1) zugeführt. In den Versuchen wurden 3 µg, 5 µg und 7 µg des Gesamtproteins eingesetzt. Der Caspase-Assay wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden je 100 µl an Caspase-Glo<sup>®</sup> Reagenz und 100 µl Probe in eine 96-Well Platte pipettiert. Des Weiteren wurde eine Leerprobe mit 100 µl PBS angelegt, um die Hintergrundlumineszenz zu erfassen. Nach einer Inkubation von 1h bei RT erfolgte die Luminometrie im Multiplattenlesegerät für 7 Zyklen à 10 min.

## 2.2.9 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.9.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach Hersteller-Protokoll mittels TRIzol<sup>®</sup> Reagenz. Dies ist eine einphasige Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat und erlaubt die sequenzielle Ausfällung von RNA, DNA und Proteinen aus Gewebe- und Zellproben (31). Den Grundstein dieser Methode legten 1987 Chomcynski und Sacchi mit ihrer *single-step* RNA-Isolationsmethode (32).

Zur Homogenisierung der als Zellpellet vorliegenden Proben wurden diese in 800 µl TRIzol<sup>®</sup> Reagenz resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei RT wurden 160 µl Chloroform hinzugeben und für weitere 3 min inkubiert.

Es folgte die Phasentrennung in einem Zentrifugationsschritt (12.000 x g für 10 min bei 4 °C), bei der sich anschließend die RNA in der obersten klaren wässrigen Phase, die DNA in der Zwischenphase und die Proteine in der Untersten befanden.

## Material und Methoden

Zur RNA-Präzipitation wurde die oberste Schicht mit großer Sorgfalt in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl Isopropanol für 10 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (12.000 x g für 10 min bei 4 °C).

Das ausgefällte RNA-Pellet wurde in 800 µl 75 % Ethanol gewaschen und in 20 µl RNase-freien Wasser resuspendiert.

Um noch vorhandene DNA-Kontaminationen aus den RNA-Proben zu entfernen, fand zusätzlich das DNA-free™ Kit (Ambion™) wie vom Hersteller empfohlen Anwendung. Dieses enthält RNase-freie DNase I und einen optimierten Reaktionspuffer für eine effektive DNA-Spaltung durch die Endonuklease. Nach dieser Behandlung wird die DNase I durch Zugabe einer DNase *Inactivation* Reagenz und anschließender Zentrifugation (10.000 x g für 1,5 min) entfernt. Der Überstand, welcher die isolierte und von DNA bereinigte RNA enthält, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach RNA-Quantifizierung (siehe 2.2.9.2) bis zur Weiterverwendung bei -80° C aufbewahrt.

### **2.2.9.2 RNA-Quantifizierung und Reinheitsbestimmung**

Die RNA-Quantifizierung und ihre Reinheitsbestimmung erfolgte am UV-Spectralphotometer (NanoDrop™ 2000c). Es wurden die Absorptionen der verdünnten RNA-Proben (je 1,5 µl) bei 260 nm ( $A_{260}$ ) und bei 280 nm ( $A_{280}$ ) gemessen. Unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes wurde die RNA-Konzentration durch die Software errechnet. Ein Absorptionswert von 1 bei 260 nm entspricht in etwa 40 µg/ml RNA, vorausgesetzt die Messung findet in einem pH-neutralen und salzarmen Milieu statt (208). Der Quotient von  $A_{260}/A_{280}$  erlaubt die qualitative Beurteilung über die Reinheit der RNA, wobei ein Wert von 2 für hochgereinigte RNA spricht. Ist das Verhältnis  $<2$  könnten Kontaminationen durch Proteine und Aromate eine Rolle spielen.

### **2.2.9.3 Reverse Transkription**

Unter der reversen Transkription versteht man die Umschreibung der RNA-Sequenz in komplementäre DNA (copy-DNA, cDNA), mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, welche auch RNA-abhängige DNA-Polymerase genannt wird. Dieser Schritt ist Voraussetzung für die folgende durch die Taq-Polymerase katalysierte

DNA-Amplifizierung (2.2.9.4), da es DNA-Polymerasen nicht möglich ist, RNA-Stränge als Matrizen zu erkennen.

Die einzelsträngige cDNA-Synthese erfolgte nach Herstellerprotokoll des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits. Es wurden pro Reaktionsansatz 10 µl des RNAase Inhibitor freien *Master Mix* und 10 µl (500 ng) Gesamt-RNA (aus 2.2.9.1) in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und vermischt.

Die Reverse Transkription erfolgte im Thermal Cycler (Applied Biosystems) nach den ebenfalls vom Hersteller empfohlenen optimierten Kit-Bedingungen: 10 min bei 25 °C; 120 min bei 37 °C; 5 min bei 85 °C; ∞ bei 4 °C. Die frisch synthetisierte cDNA wurde direkt in der folgenden Genexpressionsanalyse eingesetzt oder bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

### **2.2.9.4 Quantitative Real-Time-PCR**

Die quantitative Real-Time-PCR ist ein schnelles und einfaches Verfahren der Nukleinsäureanalytik. Sie ist eine Weiterentwicklung der klassischen PCR, welche vom späteren Nobelpreisträger Kary Mullis Mitte der 80er erstmalig veröffentlicht wurde (134). 1992 lösten die Arbeiten von Higuchi et al. das bisherige Problem der eher schlechten und sehr schwierigen Quantifizierung der DNA, mit der Einführung der PCR in Echtzeit (79). Durch kontinuierliche Fluoreszenzmessungen der amplifizierenden DNA nach jedem PCR-Zyklus, ist heute eine schnelle und genaue Quantifizierung der anfänglichen Transkriptkopienzahl möglich (131). Als Fluoreszenzfarbstoff diente in den Versuchen SYBR Green I. Dieser interkaliert mit der doppelsträngigen DNA, wodurch dessen Fluoreszenz zunimmt und im Verlauf der Real-Time-PCR mit jedem weiteren Zyklus proportional zur Menge der gebildeten Amplifikate steigt.

Die Quantifizierung erfolgte im linearen Bereich der exponentiellen Phase, da nur in dieser optimale Reaktionsbedingungen herrschen. In der Startphase ist die Templatemenge und damit die Trefferwahrscheinlichkeit für Template, Primer und Polymerase begrenzt, wohingegen in der Schlussphase (Plateauphase) die Menge an DNA so stark ansteigt, dass Produktfragmente miteinander hybridisieren und die PCR hemmen. Als Schwellenwert-Zyklus oder CT (*threshold cycle*)-Wert wird der Übergang in die exponentielle Phase bezeichnet. An diesem Punkt übersteigt die Fluoreszenz der Proben erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz (81).

## Material und Methoden

Die relative Quantifizierung erfolgte durch Normierung, sprich Mengenvergleich des Zielgens mit einem Referenzgen (*housekeeping gene*), um Abweichungen in der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA-Proben auszugleichen. Als Referenzgen wurde ribosomale RNA 18S (18S-rRNA) und als Zielgen AAT verwendet. Die Berechnung erfolgte nach der delta-delta-CT-Methode mit einbezogener Effizienzkorrektur (Pfaffl et al., 2002), dabei wurden die unterschiedlichen Genexpressionen als n-fache Expression mittels delta-delta-CT-Wert angegeben (66).

Die Real-Time-PCR wurde mit Hilfe des StepOnePlus Real-Time-PCR Systems (Applied Biosystems) und dem Power SYBR™ Green PCR Master Mix in MicroAmp® Fast Optical 96-Well Platten (Applied Biosystems™) durchgeführt. Das Pipettierschema des Mastermix und die PCR-Zyklusparameter sind weiter unten angegeben, die verwendeten Primer sind unter Punkt 2.1.6 zusammengefasst. Im Vorfeld der Messungen aller Proben fand einmalig ein Real-Time-PCR-Lauf zur Bestimmung der optimal einzusetzenden Templatekonzentration statt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen (in ng/μl) 2,5; 0,5; 0,1; 0,02 einer gepoolten cDNA-Probe (25 ng/μl) angefertigt und in Triplikaten nach u.g. Pipettierschema pipettiert und für jedes Primerpaar getestet.

Für alle folgenden Real-Time-PCR-Läufe wurden für 18S-rRNA 0,1 ng/μl cDNA und für AAT 0,5 ng/μl cDNA eingesetzt. Alle Proben wurden als Triplikate in einem Gesamtvolumen von 12 μl mit dem Mastermix in eine 96-Well Platte pipettiert.

### Pipettierschema Mastermix:

	<b>AAT (μl)</b>	<b>18S-rRNA (μl)</b>
Power SYBR™ Green PCR Master Mix 2x	6,25	6,25
<i>forward</i> -Primer (10 μM)	0,375	0,125
<i>reverse</i> -Primer (10 μM)	0,375	0,125
H <sub>2</sub> O (RNAse-/DNAse-frei)	1	1,5
cDNA Reaktionsansatz	4	4

## Material und Methoden

### Zyklusparameter:

1. Aktivierung der AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase: 95 °C für 10 min (1 Zyklus)
2. Amplifikation (40 Zyklen):

Denaturierung	95 °C für 15 sec
Primerhybridisierung und Elongation	60 °C für 60 sec
3. Kühlung 4 °C

### **2.2.10 Statistische Auswertung**

Alle Daten wurden mit der GraphPad Prism 5 Software analysiert und als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Normalverteilte ungepaarte Daten von mehreren Gruppen wurden mittels ANOVA Varianzanalyse (*analysis of variance*) und Newman Keulen Post-hoc-Test analysiert. Der t-Test diente der Auswertung ungepaarter Daten zweier Gruppen. p-Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Effekt von AAT auf die STS-induzierte Apoptoserate von PMN

Um den Wirkmechanismus von AAT im Serum von SIRS-Patienten auf die viel beschriebene Apoptose-Resistenz in PMN näher zu untersuchen, war es in einem ersten Schritt wichtig zu wissen, um welche AAT-Konzentrationen es sich in den Serumpoolproben handelt. Außerdem sollte untersucht werden, ob durch AAT-Depletion die Serum-vermittelten Effekte antagonisiert werden können. Dazu erfolgte die AAT-Immünpräzipitation (2.2.1) des auf 3 mg/ml Gesamtprotein verdünnten Serumpools mit anschließender AAT-Konzentrationsbestimmung mittels ELISA (2.2.2), was gleichzeitig der qualitativen Einschätzung der Depletion diente.

Der Tabelle 3.1 sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der AAT-Konzentrationsbestimmung vor Depletion, was der originalen AAT-Konzentration des verdünnten (3 mg/ml) Serumpools entspricht und nach zweimaliger Depletion zweier Serumpoolproben (je 300  $\mu$ l) zu entnehmen.

**Tabelle 3.1 AAT-Serumkonzentrationen vor und nach Depletion aus Serumpool von SIRS-Patienten**

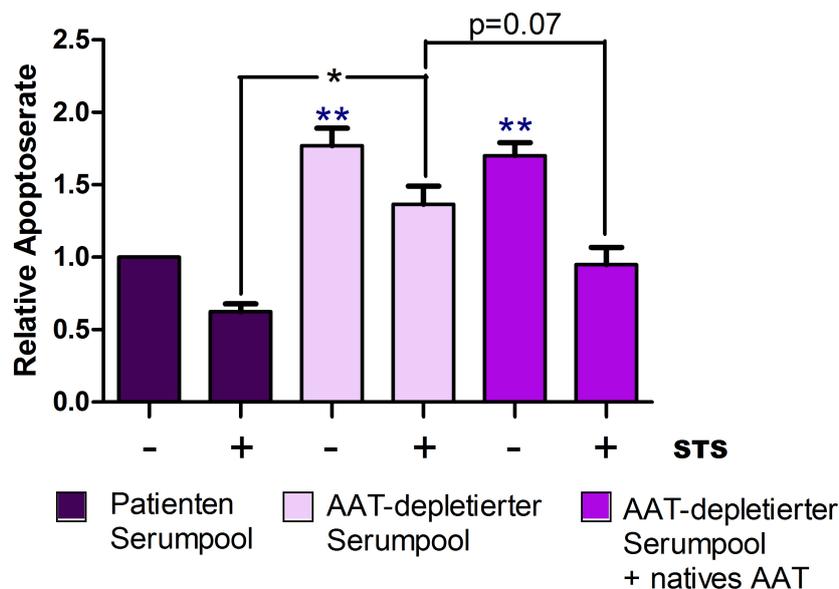
SIRS-Patienten Serumpool	VOR AAT-Depletion	NACH AAT-Depletion
AAT-Konzentration (mg/ml)	<b>9,73 <math>\pm</math> 2,3</b>	<b>5,89 <math>\pm</math> 0,2</b>

Mittels Depletion konnte die ursprüngliche AAT-Serumkonzentration von 9,73 mg/ml auf 5,89 mg/ml reduziert werden. Dies entspricht einer AAT-Elimination auf 60 % des Ausgangswertes.

Zur Untersuchung der modulatorischen Wirkung des Serum-AATs auf das PMN-Überleben gesunder Spender, wurden frisch isolierte PMN aus Buffy Coats mit 1%igen Patienten Serumpool vor und nach AAT-Depletion sowie FCS (1%; Kontrolle) behandelt. Zur Prüfung ob die beobachteten Effekte tatsächlich auf AAT

## Ergebnisse

zurückzuführen sind, wurde den mit depletierten Serumpool behandelten Zellkulturen, natives Plasma-AAT (2mg/ml) zugesetzt. Nach einer Vorinkubation von 1 h erfolgte die Zugabe von 0,2  $\mu$ M STS und nach einer Inkubationszeit von 18 h wurde die Apoptoserate der Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt (Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1 Serum-AAT vermittelte STS-Resistenz in PMN**

PMN gesunder Spender wurden in Kulturmedium RPMI+1% P/S ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml) aufgenommen und mit Patienten Serumpool (9,73 mg AAT/ml; n=13), AAT-depletierten Serumpool (5,89 mg AAT/ml; n=13) (jeweils 1 %) mit und ohne Zusatz von nativen Plasma-AAT (2mg/ml; n=4) behandelt. Nach 18 h Inkubationszeit mit und ohne STS-Zugabe (0,2  $\mu$ M) wurde die prozentuale Apoptoserate mittels FACS-Analyse ermittelt durch Bestimmung des prozentualen Anteils des hypodiploiden (sub-G<sub>1</sub>) Peaks. Der Graph zeigt die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten der relativen Apoptoseraten in Abhängigkeit von der Serum-AAT-Konzentration. \*\*p<0,01 gegenüber unbehandelter Kontrolle (FCS); \*p<0,05 (One-way ANOVA mit Newman Keulen Post-hoc-Test).

Die relative Apoptoserate war in PMN, die in Gegenwart von gepooltem Patientenserum (9,73 mg AAT/ml) kultiviert wurden, signifikant am kleinsten. Im Vergleich dazu erhöhte sich sowohl die konstitutive Apoptose als auch die STS-induzierte Apoptose in den Zellen die mit AAT-depletierten Serum (5,89 mg AAT/ml) und zusätzlich mit nativen AAT (2 mg/ml; +5,89 mg/ml) behandelt wurden. Die Ergebnisse zeigen außerdem eine verringerte AAT-abhängige Zellempfindlichkeit gegenüber dem proapoptotischen STS. So waren die in Patienten Serumpool kultivierten PMN, die entsprechend hohen AAT-Serumspiegeln ausgesetzt waren, am unempfindlichsten und zeigten den niedrigsten Anteil an apoptotischen Zellen nach STS-Behandlung. Am höchsten war dieser Anteil in PMN die mit dem AAT-

## Ergebnisse

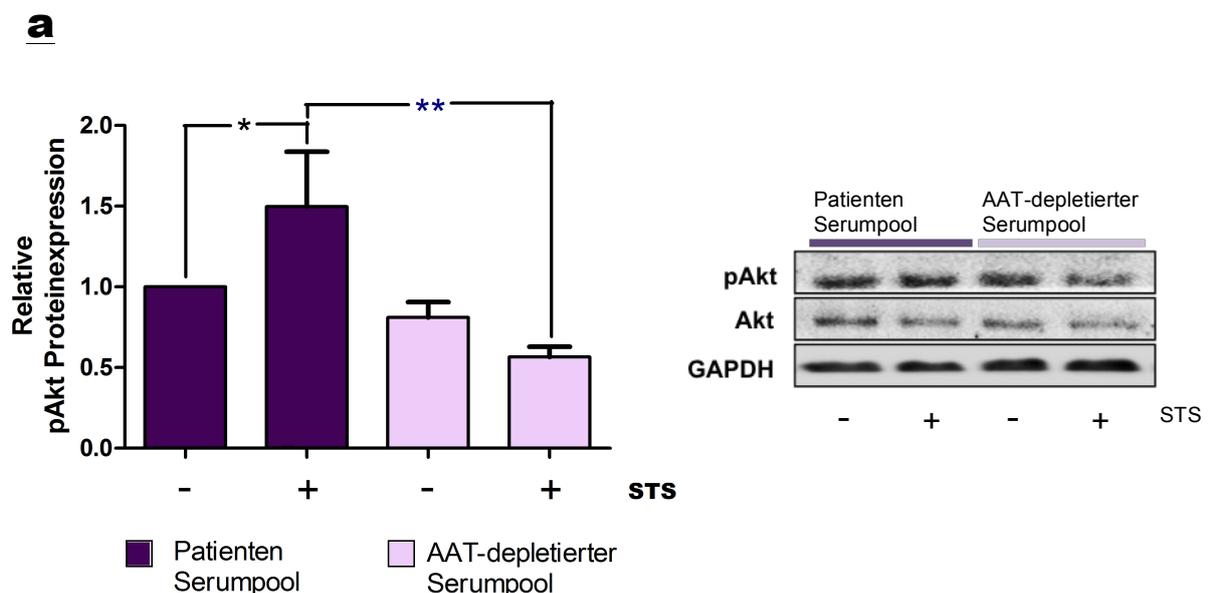
reduzierten Serum kultiviert wurden. Wie zu erwarten, wurde in allen Versuchen durch AAT-Zugabe zum AAT-depletierten Serum der STS-induzierte Zelltod der PMN reduziert, jedoch konnte keine akzeptable statistische Signifikanz erreicht werden ( $p = 0,07$ ).

### 3.2 AAT-vermittelte Modulation der PMN-Kinasesignalkaskaden PI3K/Akt und MAPK-Erk1/2

Die Kinasesignalkaskaden spielen in der Regulation der Apoptose eine wichtige Rolle. SIRS-Patientenserum hemmt die STS-induzierte Apoptose in PMN, durch Modulation der Kinasen-Aktivität und damit der Stabilität des antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieds Mcl-1.

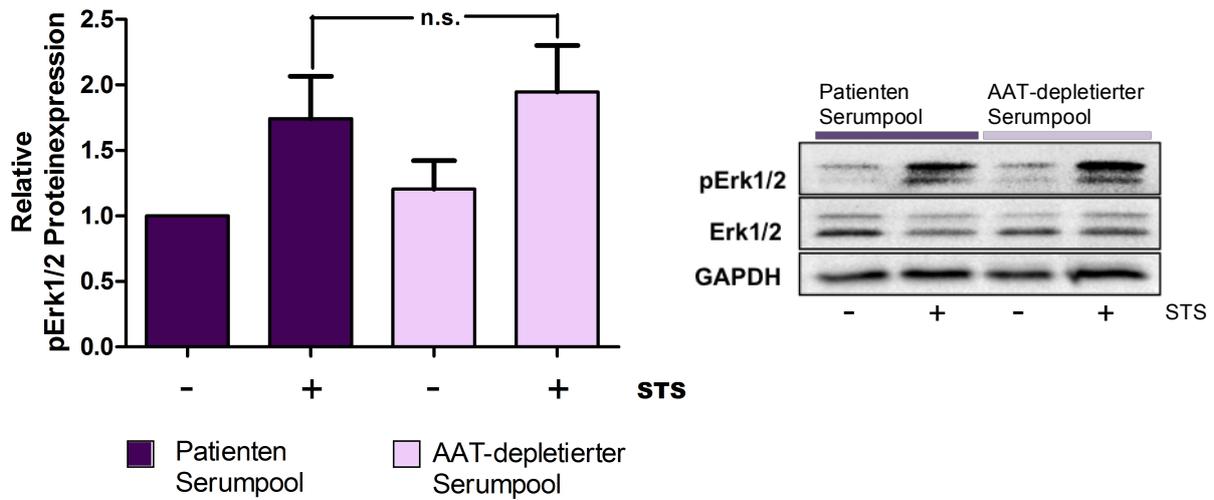
In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, ob AAT selbst die STS-induzierte intrinsische Apoptose durch Modulation der PMN-Kinasesignalkaskaden PI3K/Akt und MAPK-Erk1/2 hemmt.

Dazu wurde die Regulation der pAkt- und pErk1/2-Level in PMN auf Proteinebene im Rahmen der STS-induzierten intrinsischen Apoptose analysiert. Es wurden frisch isolierte PMN gesunder Spender mit 1%igen Patienten Serumpool vor und nach AAT-Depletion, in An- und Abwesenheit von STS kultiviert. Nach einer Inkubation von 3 h wurden die relativen Proteinexpressionen mittels Western Blot ermittelt (Abb. 3.2).



## Ergebnisse

**b**



**Abbildung 3.2 Wirkung von AAT auf die Aktivität der Kinasen pAkt (3.2a) und pErk1/2 (3.2b)**

PMN aus Buffy Coats ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden in Kulturmedium RPMI+1% P/S aufgenommen und mit Patienten Serumpool (9,73 mg AAT/ml) und AAT-depletierten Serumpool (5,89 mg AAT/ml) (jeweils 1 %) behandelt und in An- und Abwesenheit von  $0,2 \mu\text{M}$  STS kultiviert. Nach 3 h wurden die Proteinexpressionen von pAkt (a,  $n=8$  unabhängige Experimente) und pErk1/2 (b,  $n=10$  unabhängige Experimente) mittels Western Blot analysiert. Die Expressionslevel der phosphorylierten Proteine (pAkt; pErk1/2) wurden auf die der dephosphorylierten Formen dieser Proteine (Akt; Erk1/2) normiert. Das *housekeeping*-Gen GAPDH diente abschließend der Ladungskontrolle.

Die Daten sind als relative Proteinexpression dargestellt. Abgebildet sind die densitometrischen Auswertungen der Proteinexpressionen mit jeweils einer repräsentativen Western Blot-Aufnahme des phosphorylierten und dephosphorylierten Proteins, sowie der Ladungskontrolle. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; n.s.=nicht signifikant (One-way ANOVA mit Newman Keulen Post-hoc-Test).

Eine signifikante Regulation zeigte sich nur für die Überlebenskinase Akt. In PMN die mit AAT-reduziertem Serum behandelt wurden, verringerten sich die pAkt-Proteinmengen und somit die Akt-Aktivität, signifikant in Gegenwart von STS im Vergleich zu den Proteinmengen der Kontrollzellen (1% Patienten Serumpool) (Abb. 3.2a). Ebenso geht aus der Darstellung hervor, dass die pAkt-Proteinlevel in den mit Patienten Serumpool kultivierten PMN am größten sind und damit die Aktivität für Akt, wobei die Behandlung mit STS noch einmal zu einer deutlichen Zunahme führte.

Ein Einfluss der MAP-Kinase Erk1/2 konnte nicht gefunden werden. Die Aktivität nahm in den STS-behandelten Zellen zwar deutlich zu, jedoch unabhängig von der AAT-Depletion (Abb. 3.2b). Dies deutet darauf hin, dass die antiapoptotischen

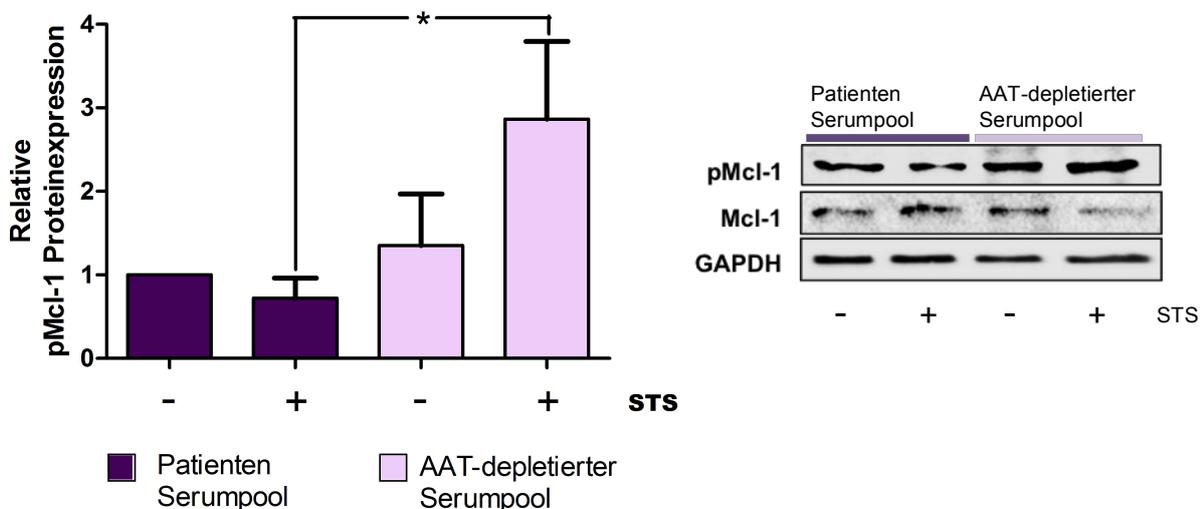
## Ergebnisse

Effekte von AAT durch Unterdrückung der PI3K/Akt-Kinasesignalkaskade vermittelt werden und nicht auf einer Modulation des MAPK-Erk1/2-Signalwegs basieren.

### 3.3 AAT-vermittelte Modulation des Proteinumsatzes von Mcl-1

Als nächstes galt es zu klären, wie sich die Erkenntnisse der AAT-vermittelten Modulation der Kinasesignalkaskade auf die Mcl-1-Proteinestabilität und dessen Abbau auswirken. In Anbetracht der Tatsache, dass die Mcl-1-Stabilität stark von ihrer posttranslationalen Modifikation abhängt, wurde die Phosphorylierung von Mcl-1 am Serin-159 in PMN gesunder Spender nach Behandlung mit AAT-depletierten und nicht depletierten Serumpool untersucht. Serin-159 ist im Mcl-1-Protein das Ziel der Phosphorylierung durch GSK-3 und dient durch den bereits beschriebenen übergeordneten Zusammenhang mit der Akt-Aktivität der Schlussfolgerung der AAT-vermittelten Effekte auf den Mcl-1-Proteinumsatz. Durch Phosphorylierung am Serin-159 wird Mcl-1 destabilisiert, des Weiteren beeinträchtigt es die Bim-Dimerisierung und damit die antiapoptotische Funktion des Mcl-1-Proteins (192).

Abbildung 3.3 zeigt die relative pMcl-1-Proteinexpression nach Behandlung der PMN mit Patientenserum bzw. AAT-depletiertem Serumpool nach einer Inkubationszeit von 3 h.



## Ergebnisse

### **Abbildung 3.3 Wirkung von AAT auf die Mcl-1-Phosphorylierung**

PMN aus Buffy Coats ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden in Kulturmedium RPMI+1% P/S aufgenommen und mit Patienten Serumpool (9,73 mg AAT/ml) und AAT-depletierten Serumpool (5,89 mg AAT/ml) (jeweils 1 %) behandelt und in An- und Abwesenheit von  $0,2 \mu\text{M}$  STS kultiviert. Nach 3 h wurde die Proteinexpression von pMcl-1 ( $n=7$  unabhängige Experimente) mittels Western Blot analysiert und auf die Proteinexpression von Mcl-1 normiert. Das *housekeeping*-Gen GAPDH diente abschließend der Ladungskontrolle. Die Daten sind als relative Proteinexpression dargestellt. Abgebildet ist die densitometrische Auswertung der Proteinexpression mit einer repräsentativen Western Blot-Aufnahme des phosphorylierten und dephosphorylierten Mcl-1-Proteins, sowie der Ladungskontrolle. \* $p < 0,05$  (t-Test)

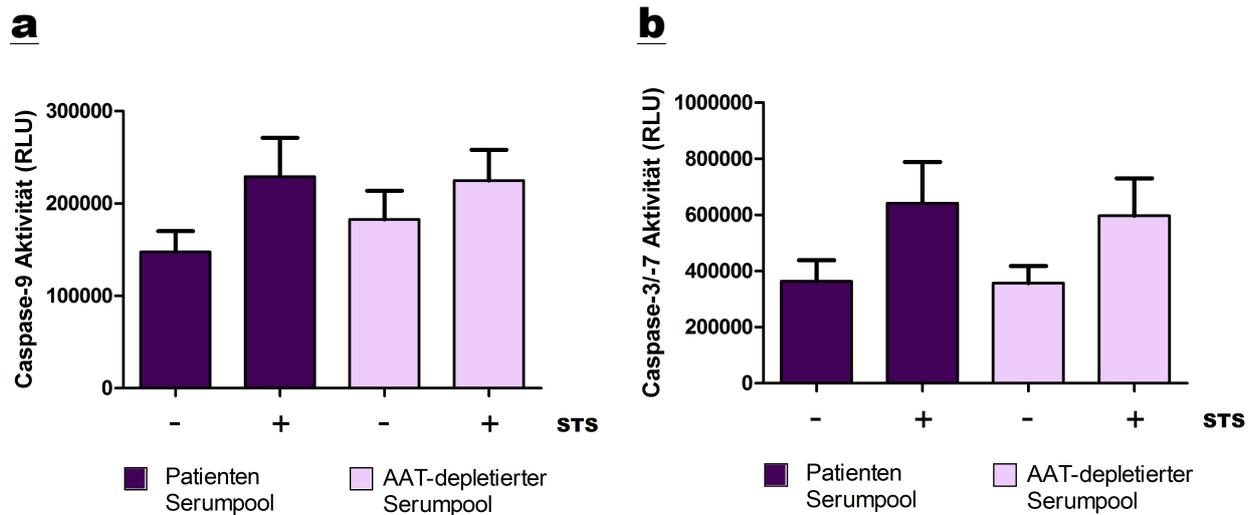
Die relative pMcl-1-Proteinexpression nimmt in den PMN die mit AAT-reduziertem Serum kultiviert wurden gegenüber den Kontroll-PMN (1% Patienten Serumpool) zu. Das Signifikanzniveau wird in den jeweils mit STS-behandelten Zellkulturen erreicht. In den mit AAT-depletiertem Serumpool kultivierten PMN steigt durch STS-Zugabe der Gehalt an pMcl-1 am stärksten, was für den höchsten Proteinumsatz bzw. für den größten Anteil an phosphorylierten und damit destabilisierten Mcl-1-Protein spricht.

### **3.4 AAT-vermittelte Wirkung auf die STS-abhängige Caspasenaktivität der Caspasen-3/-7 und -9**

Caspase-3/-7 und Casapse-9 sind Schlüsselenzyme der Apoptose. Caspase-9 ist die Initiator-Caspase des intrinsischen Signalweges, welche nach Aktivierung durch das Apoptosom, ihrerseits die Effektorcaspasen-3/-7 aktiviert. Diese sind essentiell für die Exekution der Apoptose und gemeinsame Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Signalweges.

Um zu untersuchen, ob AAT die Aktivitäten der Caspasen-3/-7 und -9 moduliert und darüber die AAT-vermittelte intrinsische Apoptose-Resistenz beeinflusst, wurden frisch isolierte PMN aus Buffy Coats mit 1%igen Patienten Serumpool vor und nach AAT-Depletion, in An- und Abwesenheit von STS kultiviert. Nach 4 h Inkubationszeit wurden die Aktivitäten von Caspase-3/-7 (Abb. 3.4b) und Caspase-9 (Abb. 3.4a) mittels Lumineszenzassay quantifiziert.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.4 Wirkung von AAT auf die Aktivität der Caspase-9 (3.4a) und Caspase-3/-7 (3.4b)**

PMN aus Buffy Coats ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden in Kulturmedium RPMI+1% P/S aufgenommen und mit Patienten Serumpool (9,73 mg AAT/ml) und AAT-depletierten Serumpool (5,89 mg AAT/ml) (jeweils 1 %) behandelt und in An- und Abwesenheit von  $0,2 \mu\text{M}$  STS kultiviert. Nach 4 h wurden die Aktivitäten der Caspase-3/-7 und Caspase-9 mit Hilfe des lumineszierenden Caspase-Glo<sup>®</sup>-3/7 und -9 Assays bestimmt. Die Lumineszenz ist als Maß für die Caspase-Aktivität als (Assay-spezifische) *relative light units* (RLU) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM von neun unabhängigen Experimenten dargestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (One-way ANOVA mit Newman Keulen Post-hoc-Test).

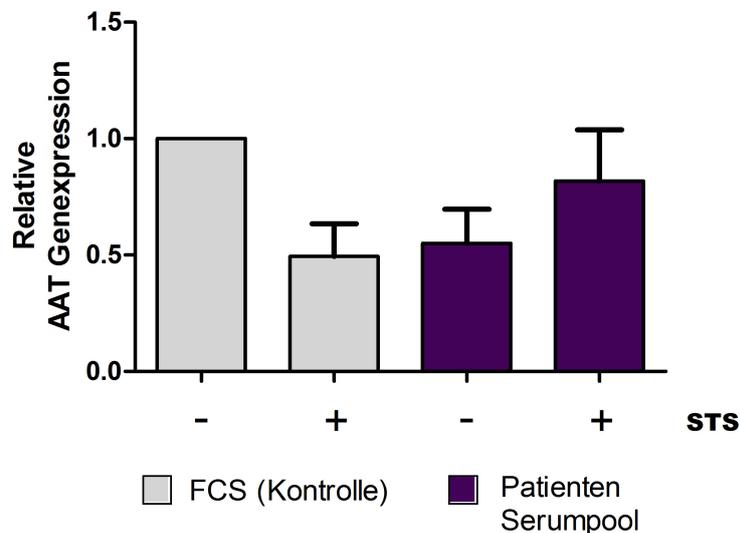
Die STS-Behandlung der kultivierten Zellen führt sowohl bei Caspase-9 (Abb. 3.4a) als auch bei Caspase-3/-7 (Abb. 3.4b) zu einem leichten aber nicht signifikanten Anstieg der Aktivität, jedoch völlig unabhängig vom AAT-Serumspiegel. Weiter geht aus dem Vergleich der Ergebnisse hervor, dass die generelle Aktivität der Caspase-3/-7 sowohl ohne als auch mit STS rund 2,6-fach höher als die Aktivität von Caspase-9 ist.

### 3.5 Korrelation zwischen intrinsischer Apoptose-Resistenz und AAT-Genexpression in SIRS-Patientenserum kultivierten PMN

Um zu prüfen, ob sich Veränderungen in der AAT-Genexpression in PMN gesunder Probanden durch die Behandlung mit SIRS-Patientenserum ergeben und ob sich daraus Hinweise auf die serumvermittelte intrinsische Apoptose-Resistenz ableiten lassen, wurden frisch isolierte PMN aus Buffy Coats isoliert und mit 1%igen unverdünnten Patienten Serumpool (48,8mg Gesamtprotein/ml) und 1%igen FCS in An- und Abwesenheit von STS kultiviert. Nach 14 h erfolgte die Zugabe von BFA (3

## Ergebnisse

µg/ml) zur Zellkultur für weitere 4 h. Nach einer Gesamtinkubationszeit von 18 h wurde die Genexpression von AAT mittels qRT-PCR quantifiziert (Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5 SIRS-Patientenserum hat keinen Einfluss auf die AAT-Genexpression in PMN gesunder Spender**

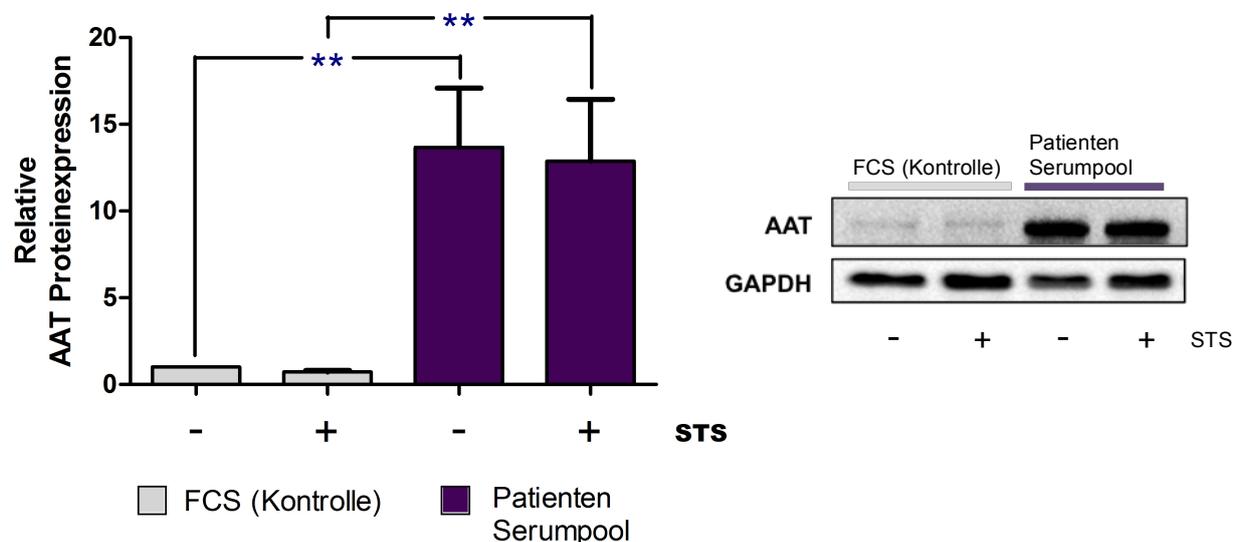
PMN aus Buffy Coats ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden in Kulturmedium RPMI+1% P/S aufgenommen und mit Patienten Serumpool (48,8 mg Gesamtprotein/ml) und FCS (jeweils 1 %) behandelt und in An- und Abwesenheit von 0,2 µM STS kultiviert. Nach 14 Stunden erfolgte die Zugabe von 3 µg/ml BFA zu den Zellkulturen für weitere 4 h. Nach insgesamt 18 h wurde die Expression von AAT auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR untersucht und auf die mRNA-Expression des Referenzgens 18S normiert. Die Daten für die AAT mRNA-Expression wurden anschließend mit der AAT mRNA-Expression in den Kontroll-PMN verglichen. Die Ergebnisse sind als relative Genexpression von sieben unabhängigen Experimenten dargestellt. Es konnten keine statistischen Unterschiede festgestellt werden (One-way ANOVA mit Newman Keulen Post-hoc-Test).

Wie aus Abbildung 3.5 hervorgeht, zeigen sich keine nennenswerten Veränderungen der relativen AAT-Genexpressionen zwischen den Kontroll-PMN und den mit SIRS-Patienten Serumpool behandelten PMN. Ebenso ist eine STS-abhängige Veränderung in der Regulation der AAT-Genexpression in beiden Zellkulturen ausgeblieben. Diese Beobachtungen geben keinen Hinweis auf den Einfluss von SIRS-Patientenserum auf die AAT-Genexpression in PMN gesunder Spender.

### 3.6 Korrelation zwischen intrinsischer Apoptose-Resistenz und AAT-Proteinexpression in SIRS-Patientenserum kultivierten PMN

Als nächstes lag der Focus auf der AAT-Proteinexpression in PMN gesunder Probanden und ob diese durch Kultivierung mit Patienten Serumpool erhöht und somit die intrinsische Apoptose-Resistenz beeinflusst wird.

Um die Expression von AAT auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden PMN aus Buffy Coats isoliert und in FCS bzw. unverdünnten Patienten Serumpool (je 1%) in An- und Abwesenheit von STS kultiviert. Nach 14 h erfolgte die Zugabe des intrazellulären Proteintransport-Inhibitors BFA (3 µg/ml) zur Zellkultur. Durch diese Blockade gelangen Proteine nicht mehr zum Golgi-Apparat und akkumulieren im endoplasmatischen Retikulum (ER) (59). Nach weiteren 4 h Inkubation wurde die relative AAT-Proteinexpression mittels Western Blot ermittelt (Abb. 3.6).



**Abbildung 3.6 SIRS-Patientenserum induziert intrinsische Apoptose-Resistenz durch Hochregulation der AAT-Proteinexpression in PMN gesunder Spender**

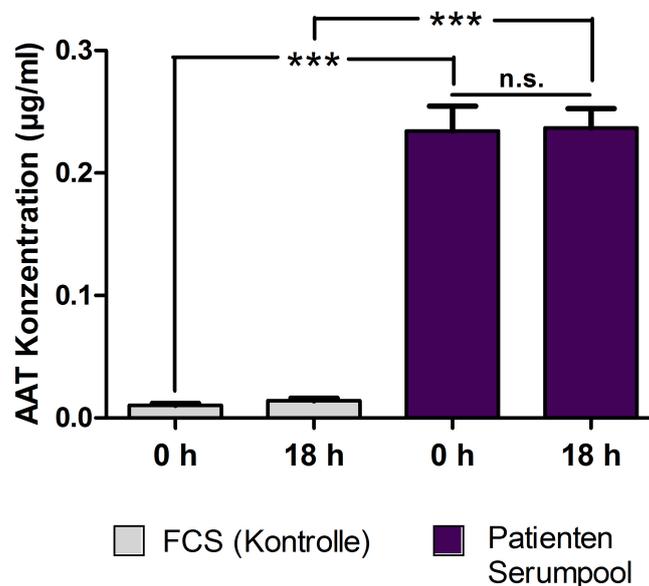
PMN aus Buffy Coats ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden in Kulturmedium RPMI+1% P/S aufgenommen und mit Patienten Serumpool (48,8 mg Gesamtprotein/ml) und FCS (jeweils 1 %) behandelt und in An- und Abwesenheit von 0,2 µM STS kultiviert. Nach 14 Stunden erfolgte die Zugabe von 3 µg/ml BFA zu den Zellkulturen für weitere 4 h. Nach insgesamt 18 h wurde die Proteinexpression von AAT (n=5 unabhängige Experimente) mittels Western Blot analysiert und auf die Proteinexpression des Referenzgens GAPDH normiert. Die Daten sind als relative Proteinexpression dargestellt. Abgebildet ist die densitometrische Auswertung der Proteinexpression mit repräsentativen Western Blot-Aufnahmen. \*\*p<0,01 (One-way ANOVA mit Newman Keulen Post-hoc-Test).

## Ergebnisse

Bemerkenswerterweise zeigte sich eine deutliche Zunahme der intrazellulären AAT-Proteinexpression in den mit SIRS-Patientenserum kultivierten PMN. Im Vergleich dazu wurde in den mit FCS-behandelten Kontroll-PMN nahezu kein AAT exprimiert. Eine Regulation nach STS Behandlung war nicht ersichtlich.

Um zu prüfen, ob das AAT von den Zellen selbst exprimiert oder aus dem extrazellulären Raum aufgenommen wurde, erfolgte anschließend die Quantifizierung der AAT-Konzentration im Zellkulturmedium.

Dazu wurde die AAT-Konzentration mittels ELISA in den Kontroll-PMN und den mit SIRS-Patientenserum kultivierten PMN am Anfang (0h) und am Ende (18 h) der Versuchsreihe aus den Kulturüberständen bestimmt (Abb. 3.7).



**Abbildung 3.7 AAT-Konzentrationsanstieg der in SIRS-Patientenserum kultivierten PMN wird ausschließlich durch intrazelluläre Proteinexpression verursacht**

PMN aus Buffy Coats ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden in Kulturmedium RPMI+1% P/S aufgenommen und mit Patienten Serumpool (48,8 mg Gesamtprotein/ml) und FCS (jeweils 1 %) behandelt und kultiviert. Nach 14 Stunden erfolgte die Zugabe von 3 µg/ml BFA zu den Zellkulturen für weitere 4 h. Zu Beginn 0h und am Ende 18 h der Inkubationszeit wurde die AAT-Konzentration mittels ELISA quantifiziert. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. \*\*\* $p < 0,001$ ; n.s.=nicht signifikant (One-way ANOVA mit Newman Keulen Post-hoc-Test).

Wie in Abbildung 3.7 zu sehen ist, änderten sich die AAT-Konzentrationen in den Kulturüberständen im Laufe der Zeit nicht. Deshalb kann man annehmen, dass die intrinsische Apoptose-Resistenz der PMN und die hochregulierte AAT-Proteinexpression nicht auf einer extrazellulären AAT-Aufnahme beruhen. Ebenso

## Ergebnisse

zeigen diese Daten, dass neu synthetisiertes AAT effizient in den Zellen zurückgehalten wird.

Ebenso wird noch einmal der deutliche Unterschied der AAT-Konzentration zwischen den Kulturüberständen der mit FCS und mit Patienten Serumpool behandelten PMN ersichtlich.

## 4 Diskussion

PMN sind essentielle Zellen des angeborenen unspezifischen Immunsystems und stellen als Hauptakteure während einer akuten Infektion, die erste Verteidigungslinie gegen Pathogene im Organismus dar. Mittels Tötungsmechanismen wie Phagozytose, Degranulation, oxidativer Burst sowie das Ausschleudern der NETs, auch als NETose bezeichnet, können sie effektiv Bakterien, Pilze und Protozoen eliminieren (1, 20, 72, 97, 138). PMN sind damit von großer Bedeutung für die Resolution einer Inflammation.

Auf der anderen Seite birgt dieses wirkungsvolle, allerdings recht unspezifische Vorgehen der PMN gewebstoxisches Potential und kann zu Kollateralschäden im gesunden Gewebe führen und langanhaltende Entzündungen verursachen (Duffin et al., 2010). Dabei ist eine verzögerte spontane PMN-Apoptose von pathogenetischer Bedeutung. Erhöhte Zellzahlen und verlängerte Zirkulationslebensdauer der PMN mit konsekutiver Schädigung des Organismus resultieren. Des Weiteren können sie dadurch die Entstehung verschiedener Pathologien begünstigen, wie SIRS und MOF bspw. in Folge schwerer Traumata oder im Rahmen postoperativer Komplikationen (92, 149).

Nützlich zur Identifizierung potentieller krankheitsbezogener Marker, sowie zum besseren Verständnis der Pathogenese von Krankheiten und der Immunantwort des Wirts, ist die Analyse des humanen Proteoms, da verschiedene Plasmaproteine eine schnelle Veränderung des Expressionsmusters als Antwort auf Krankheitszustände und eine direkte Korrelation mit der Krankheitsprogression zeigen (Ray et al., 2011). In dieser Hinsicht ist gut dokumentiert, dass menschliches Serum reichhaltig an Wachstumsfaktoren und antiapoptotischen Molekülen ist, und dass ein Mangel an diesen Serumfaktoren den apoptotischen Zelltod in vielen Zelltypen provoziert (19, 28, 175). Serumspiegel an antiinflammatorischen Faktoren nehmen während einer akuten Entzündung wie SIRS deutlich zu und beeinflussen stark das Überleben von Immunzellen, einschließlich der PMN.

Viel Aufmerksamkeit als potentielles Target bei der Entwicklung neuartiger entzündungshemmender Mittel genießt Proteinkinase C (PKC). Mehrere

## Diskussion

experimentelle Studien zeigten in Modellen für Entzündungserkrankungen eine verminderte Gewebeswellung, sowie eine Reduktion des PMN-Einstroms und der vaskulären Permeabilität durch den Einsatz von PKC-Inhibitoren (14, 44, 88).

Studien dieser Arbeitsgruppe belegen, dass Serum von SIRS-Patienten die Apoptose stark unterdrückt, die durch den PKC-Inhibitor STS in verschiedenen myeloischen und lymphoiden Zelllinien einschließlich PMN induziert wird (150).

Bemerkenswerterweise wurde die Apoptose-Resistenz von PMN unter pathologischen Bedingungen vornehmlich mit schädlichen Wirkungen in Verbindung gebracht, und es wurde gezeigt, dass eine starke Reduktion des PMN-Zelltods mit einem erhöhten Risiko für MOF und Sepsis bei schwer verletzten Patienten verbunden ist (148). So überrascht es nicht, dass häufige Komplikationen auf Intensivstationen durch PMN-gebundene Kollateralschäden, begleitet von endotheliale Leckage und Organdysfunktion verursacht werden. Obwohl die therapeutische Anwendung von Zytokinfiltern bei SIRS-Patienten erste positive Effekte zeigte (Träger et al., 2016), sind die Serumfaktoren, die an der Regulation der Apoptose von PMN beteiligt sind, nicht vollständig identifiziert.

Mehrere Studien berichteten bereits über einen Zusammenhang zwischen stark erhöhten AAT-Serumspiegeln und entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Vaskulitis, Karzinomatose, bakterieller Infektionen und SIRS (71, 114).

Hier wurde natives menschliches AAT (auch bekannt als Serpin A1) näher beleuchtet, das den am häufigsten vorkommenden zirkulierenden Serinproteaseinhibitor im menschlichen Plasma darstellt und als kritischer Mediator der intrinsischen PMN-Apoptose bei SIRS-Patienten gilt.

Das Ziel dieser Arbeit war es den bisher wenig erforschten molekularen Signalweg der AAT-vermittelten intrinsischen Apoptose-Resistenz in PMN näher zu charakterisieren. Es wurde der Einfluss von SIRS-Patientenserum mit stark erhöhten AAT-Serumspiegeln und AAT-depletierten Serumspiegeln auf die prozentuale Apoptoserate sowie die Regulation der AAT-vermittelten intrinsischen Apoptose-Resistenz auf Gen- und Proteinexpressionsebene in PMN gesunder Spender untersucht.

## Diskussion

AAT ist ein 52 kDa Glykoprotein, das hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird (114). Aber auch in extrahepatischen Geweben und Zellen, einschließlich PMN, Monozyten und Makrophagen, Alveolarmakrophagen, Darmepithelzellen, Mammarkarzinomzellen und der Cornea wird AAT synthetisiert (57, 129, 151, 198, 207). AAT wird in den meisten Geweben und Körperflüssigkeiten gefunden und ist ein Akute-Phase-Protein, dessen Plasmakonzentration während einer Entzündung, Infektionen und malignen Erkrankungen 3-4 mal höher als normal (1,34 mg/ml) ansteigen kann (89). Die Gewebekonzentrationen von AAT infolge lokaler Synthese durch residente oder eingewanderte Entzündungszellen können sogar bis zu 11-fach erhöht sein (17). Darüber hinaus wird eine erhöhte AAT-Produktion und Sekretion hauptsächlich durch proinflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  vermittelt, die die AAT-Expression unterschiedlich stark induzieren können (213). In dieser Hinsicht wurde bereits gezeigt, dass humane Alveolarmakrophagen als Reaktion auf die Zytokinstimulation und Monozyten in Folge bakterieller LPS-Exposition zu den AAT-Spiegeln im Gewebe beitragen können (8, 96).

Für die Versuche der Studie wurde ein Serumpool von verschiedenen Patienten mit SIRS des ersten p.o. Tages hergestellt. Die AAT-Konzentration betrug im Mittel 9,73 mg/ml und entsprach somit einer 7-fachen Erhöhung des physiologischen AAT-Serumspiegels. Weder Populationsvarianzen noch präoperativer Gesundheitszustand waren bekannt, was zu berücksichtigen gilt, da sowohl Alter als auch Geschlecht wichtige Kovariaten für Serum-AAT sind und ein präoperativ erhöhtes AAT die Effekte vermutlich noch einmal verstärkt (169). Ebenso könnte dies eine Erklärung für die Standardabweichung von 2,3 mg/ml im SIRS-Patienten Serumpool sein.

Die ermittelte AAT-Konzentration und die große interindividuelle Variabilität korreliert mit Untersuchungen der Arbeitsgruppe, in denen die AAT-Serumspiegel von schwer verletzten Patienten mindestens bis zu den Tagen 10-11 nach Aufnahme deutlich über den Kontrollwerten lagen (173). Höhere Ausgangswerte hätten in den Experimenten vermutlich erreicht werden können, wenn der Serumpool vom 5-6 p.o. Tag erstellt worden wäre, da Voruntersuchungen zeigten, dass im p.o. Verlauf zu diesem Zeitpunkt die Maximalwerte erreicht wurden (Sarabhai et al., 2017). Durch AAT-Depletion konnte die AAT-Konzentration auf 5,89 mg/ml im Mittel reduziert werden. Dies entspricht zwar einer Reduktion auf

## Diskussion

rund 60 % des Ausgangswertes, allerdings immer noch einer Erhöhung um das 4-fache in Bezug auf physiologische AAT-Serumwerte. Es ist also anzunehmen, dass die Effekte durch AAT-Depletion eine noch größere Relevanz haben als bereits in den durchgeführten Versuchen gezeigt werden konnte.

In den Untersuchungen zur modulatorischen Wirkung des Serum-AATs auf das PMN-Überleben gesunder Spender, konnte die direkte Korrelation zwischen dem AAT-Level im Serum und der PMN-Apoptose-Resistenz gegenüber STS bewiesen werden (Abb. 3.1). Dementsprechend untermauert dies die Ergebnisse von Paunel et al. in denen bis mindestens zum 10. Tag nach schwerem Trauma eine STS-Resistenz in PMN beobachtet wurde (149). In den AAT-depletierten Proben war die prozentuale Apoptoserate, sowohl die konstitutive als auch die STS-induzierte Apoptoserate der PMN am größten. Durch Zugabe von nativen AAT (2 mg/ml) sollte der Effekt der Immunpräzipitation auf das Überleben der PMN antagonisiert werden. Auch wenn dabei die statistische Signifikanz nicht ganz erreicht wurde, konnte dennoch eine Abnahme der STS-vermittelten Apoptose und damit eine Zunahme der Unempfindlichkeit gegenüber STS durch den AAT-Anstieg verzeichnet werden und erlaubt damit einen vorsichtigen Rückschluss auf die serumvermittelten Effekte von AAT. Bei diesen Ergebnissen muss beachtet werden, dass in der Immunpräzipitation der AAT-Serumspiegel auf 60 % des Ausgangswertes reduziert wurde, allerdings nach Zugabe von nativen Plasma-AAT nur auf 81 % gehoben wurde, was den eingeschränkten antagonistischen Effekt teilweise erklärt. Außerdem könnten die später noch näher erläuterten Unterschiede zwischen dem nativen aufgereinigten AAT und dem AAT im Patienten Serumpool und sich daraus ergebende veränderte biologische Aktivitäten, weitere zu berücksichtigende Faktoren sein.

Die Frage ob das von PMN exprimierte AAT, das zirkulierende Serum-AAT oder sogar beide obligatorisch für die intrinsische Apoptose-Resistenz sind, konnte nicht abschließend beantwortet werden. Jedoch demonstrieren die Ergebnisse zur Korrelation der intrinsischen Apoptose-Resistenz und der AAT-Proteinexpression, dass die antiapoptotische Wirkung des SIRS-Patientenserum auf PMN gesunder Spender von einer intrinsischen Hochregulation der AAT-Proteinexpression begleitet wird (Abb. 3.6). Obwohl die Mechanismen, die für die Zunahme von AAT

## Diskussion

verantwortlich sind, kaum verstanden werden, zeigten bereits die Arbeiten von Perlmutter und Knoell, dass humane PMN, neben Monozyten und Alveolarmakrophagen die Expression von AAT als Antwort auf Entzündungsmediatoren wie IL-6, bakterielles LPS und als Reaktion auf AAT selbst erhöhen (96, 152). Letzteres trifft sicher im verwendeten Serumpool zu, aber auch der Einfluss von Entzündungsmediatoren kann unter SIRS-Bedingungen stark angenommen werden, ohne dies näher untersucht zu haben. In welchem Ausmaß das von PMN exprimierte AAT zum Gesamt-AAT-Serumspiegel beiträgt und ob PMN tatsächlich eine potentielle Quelle für kritische Veränderungen des AAT-Serumspiegels darstellen, kann aus diesen Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

Damit übereinstimmend zeigten Clemmensen et al. in einer Studie zur Lokalisation und Produktion von AAT in gesunden Spender-PMN, dass die in vitro-Stimulation von humanen PMN mit inflammatorischen Serumfaktoren, wie G-CSF, die AAT-Expression in diesen Zellen deutlich hochregulierte. Es wurde zusätzlich berichtet, dass AAT, von dem bekannt ist, dass es in allen Granulasubtypen gespeichert ist, nicht von den Zellen konstitutiv sezerniert wird, sondern eher durch Stimulation mit N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP; Signal zur Erkennung einer bakteriellen Infektion) oder dem PKC-Aktivator Diacylglycerin-Struktur analogon Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) (Clemmensen et al., 2011). Daher schließen die in-vitro-Befunde dieser Studie, die eine AAT-Akkumulation in stimulierten PMN zeigten (Abb. 3.7), die Möglichkeit nicht aus, dass sowohl zirkulierende als auch Gewebe-PMN eine in vivo-Quelle für extrazelluläres AAT bei entzündlichen Insulten darstellen.

AAT wurde ursprünglich als ein natürlich vorkommender zirkulierender Serinproteaseinhibitor beschrieben, der primär die potentiell destruktive proteolytische Aktivität der Neutrophilen-Elastase hemmt, die PMN am Ort der Entzündung sezernieren (178). Inzwischen ist es offensichtlich geworden, dass AAT ein multifunktionelles Protein mit antiinflammatorischen, zytoprotektiven sowie immunregulatorischen Eigenschaften ist, die über die Antiprotease-Rolle hinausgehen. Zahlreiche Studien berichteten von überwiegend protektiven Wirkungen der AAT-Erhöhung unter Inflammation, einschließlich Regulation der CD14-Expression und -Freisetzung in Monozyten sowie Hemmung der LPS-vermittelten Monozyten-Aktivierung, Hemmung der TNF- $\alpha$ -Genexpression und in-

## Diskussion

vitro-Neutrophilenmigration (90, 142, 187, 188). Darüber hinaus steht die antiinflammatorische und gewebeschützende funktionelle Rolle von AAT teilweise im Zusammenhang mit dessen Fähigkeit die zelluläre Apoptose zu hemmen (153). Im Allgemeinen scheint der Einfluss von AAT auf die apoptotischen Prozesse jedoch vielfältig zu sein. Auf der einen Seite könnte AAT die PMN-Apoptose durch einen Weg induzieren, der endoplasmatischen Retikulumstress und TNF- $\alpha$ -Signalisierung beinhaltet (Hurley et al., 2014). Auf der anderen Seite ist in der Literatur zu finden, dass die antiapoptotische Wirkung von AAT auf der Hemmung der Caspasenaktivitäten wie Caspase-1 und Caspase-3 beruht (153, 195). In dieser Studie führte die AAT-Depletion aus dem Serum zwar zur signifikanten Zunahme der spontanen PMN-Apoptose jedoch bei unveränderter Caspasenaktivität (Abb. 3.4). Im Gegensatz dazu, modulierte die Zugabe von nativen AAT zum depletierten Serumpool nicht den spontanen apoptotischen Zelltod der PMN, was für eine veränderte biologische Aktivität des Serum-AATs bei SIRS-Patienten spricht.

In der Tat ist bekannt, dass mehrere AAT-Isoformen existieren und dass es Unterschiede zwischen dem AAT, welches von Hepatozyten und jenem, das von PMN in der Inflammation synthetisiert wird, gibt (35, 123). Obwohl die zurückliegenden experimentellen Befunde der Arbeitsgruppe und die Ergebnisse dieser Arbeit eindeutig zeigen, dass PMN von SIRS-Patienten sowie PMN gesunder Spender auf in-vitro-Serumstimulation AAT exprimieren, erklären sie nicht, wie dieses neu synthetisierte AAT zur Hemmung der Apoptose beiträgt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass intrinsisches AAT der PMN wichtig für eine langfristige Aufrechterhaltung der Resistenz gegen Apoptoseinduktoren in Abwesenheit verschiedener entzündlicher Faktoren ist. Diese Vermutung stimmt mit der Tatsache überein, dass PMN von Traumapatienten mit SIRS eine Resistenz gegenüber dem intrinsischen Apoptoseinduktor STS bei Kultivierung in serumfreiem Kulturmedium beibehalten (150).

Die Hemmung der STS-ausgelösten Apoptose durch AAT wurde zuvor schon von anderen Autoren gezeigt. In dieser Hinsicht demonstrierten Petrache et al., dass primäre pulmonale Endothelzellen humanes AAT internalisieren, welches kolokalisierte und die STS-induzierte Caspase-3-Aktivierung inhibierte. In zellfreien Systemen inhibierte natives AAT die Interaktion zwischen der rekombinanten aktiven Caspase-3 und ihrem spezifischen Substrat stark (153). Diese

## Diskussion

Beobachtungen konnten hier nicht bestätigt werden. Da die AAT-Immundepletion aus dem Patientenserum trotz verstärkter Apoptose nicht zu einer Hochregulierung der Aktivität von Caspase-3/-7 oder Caspase-9 nach STS-Behandlung führte. Somit scheint AAT nicht ausschließlich die Aktivierung der Caspasen zu beeinflussen. An dieser Stelle muss noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die AAT-Depletion den AAT-Serumspiegel im SIRS-Patienten Serumpool nur reduzierte und nicht komplett eliminierte und daher eine partielle inhibitorische Wirkung durch Serum-AAT nicht auszuschließen ist. Darüber hinaus könnten auch andere Serumfaktoren im Patientenserum die Hemmung der Caspasenaktivität in PMN vermitteln. Unterstützend kommt hinzu, dass in den weiteren Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die AAT-vermittelte Hemmung der intrinsischen Apoptose in PMN auch durch Caspase-unabhängige Signalwege bedingt werden kann.

In dieser Hinsicht wurde bereits in der Literatur darüber berichtet, dass die Expression von Mcl-1 entscheidend für das Überleben von PMN und die STS-Resistenz ist (150). Daher stellte sich die Frage, ob AAT, ähnlich wie die gesamte Serumfraktion von SIRS-Patienten, die STS-ausgelöste Apoptose durch Förderung der Akt-Aktivierung und Verhinderung des Mcl-1-Abbaus verhindert. Tatsächlich führte die Senkung des Serum-AAT-Spiegels in den Experimenten zu einer signifikanten Abnahme von pAkt und zu einem Anstieg der Mcl-1-Phosphorylierung, was von einem erhöhten Proteinumsatz sowie einer beschleunigten intrinsischen und spontanen Apoptose begleitet wurde. (Abb. 3.1, 3.2a und 3.3). Diese Beobachtungen erlauben die Annahme einer Schlüsselrolle des PI3K/Akt-Signalwegs für die AAT-vermittelten antiapoptotischen Signalwege in PMN.

Keine regulatorischen Veränderungen durch Serum-AAT konnten bei der Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk1/2 gefunden werden, von der bekannt ist, dass sie die Mcl-1-Proteinstabilisierung durch Phosphorylierung an Threonin-163 fördert. Bekräftigt werden diese Ergebnisse durch die Daten von Nifoussi et al., die bei Untersuchungen zur Mcl-1-Stabilität als wichtige Determinante bei der Arzneimittelresistenz in der Krebstherapie herausfanden, dass die Erk1/2-Aktivierung den Mcl-1-Umsatz nur in Zellen reduziert, in denen der Mcl-1-Abbau

## Diskussion

nicht von der GSK-3-induzierten Phosphorylierung an Serin-159 und damit vom Akt/GSK3-Signalweg abhängt (141).

Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann man annehmen, dass eine starke PKC / Akt-Aktivierung in humanen PMN während einer akuten Entzündung, die teilweise durch zirkulierendes Serum-AAT vermittelt wird, die Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber PKC-Inhibitoren wie STS deutlich herabsetzt. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen von Kim et al. gestützt, die der Frage nach den Signalwegen der NADPH-Oxidase-Aktivierung in PMN nachgingen und dabei die PKC-vermittelte Akt-Aktivierung in PMN zeigten (94). Tatsächlich scheint das proapoptotische STS in Patientenserum kultivierten PMN einen gegenregulatorischen Überlebensweg auszulösen, begleitet von einer Erhöhung der Akt-Aktivität und einer Herabregulation apoptotischer Signalwege. Die Antwort auf die Frage, wie AAT diesen Mechanismus in Anspruch nimmt, bleibt unklar. Die Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Serumreduktion von AAT die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber proapoptotischen Stimuli erhöhen konnte, was das Überleben von PMN bei systemischen Entzündungen, wie dem SIRS begrenzt und damit einen Beitrag zur antiinflammatorischen Reaktion leistet. Darüber hinaus ist dies vermutlich die erste Studie, die zeigen konnte, dass die antiapoptotischen Wirkungen von AAT Mcl-1-Regulationswege einbetten.

Grundsätzlich ist noch festzuhalten, dass PMN als eher empfindliche und nur schlecht kultivierbare Zellen des Immunsystems gelten, die allgemein anerkannt sind als komplizierte Killer der mikrobiellen Infektion. In der Literatur wird in zahlreichen Experimenten mit PMN von einer starken Abhängigkeit der Ergebnisse vom Spender bzw. von dessen Immunstatus berichtet. Traumata und operative Eingriffe an sich, sowie im Falle von Herzoperationen unter Einsatz der Herzlungenmaschine bedeuten für den Patienten akute Belastungen, die unter dem starken Einfluss immunologischer Veränderungen stehen. Diese Veränderungen betreffen insbesondere den Grad der Immunaktivierung und –deaktivierung bis hin zur Immunparalyse und sind eng mit dem klinischen Verlauf in Form von Organdysfunktionen und infektiösen Komplikationen vergesellschaftet. Hier wurde durch die Verwendung von PMN aus Buffy Coats, unter der Annahme dass die

## Diskussion

Blutspende ausschließlich vollkommen gesunden Probanden vorbehalten ist, versucht diese Form der Verzerrung von Ergebnissen zu minimieren.

Es ist ferner zu bedenken, dass die Isolation und Analyse zirkulierender PMN nicht notwendigerweise Rückschlüsse auf das Verhalten von PMN im entzündeten Gewebe zulässt. Das dort vorherrschende Milieu könnte das Apoptoseverhalten von PMN noch stärker beeinflussen. Außerdem wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass PMN mit anderen Zellen des Immunsystems interagieren und funktionell interferieren (191). Des Weiteren sind Patienten auf einer Intensivstation unterschiedlichen Bedingungen in Form von verschiedenen operativen Eingriffen und einer individuellen Pharmakotherapie ausgesetzt. So zeigten die Daten von Hsing und Kollegen das insbesondere das viel genutzte Anästhetikum Propofol die konstitutive Apoptose inhibiert über eine PI3-Kinase/Akt-vermittelte GSK-3-Inaktivierung und Mcl-1-Stabilisierung (Hsing et al., 2015). Zusätzlich verkomplizieren den Sachverhalt zwei kürzlich in der Nature veröffentlichte Studien, die zeigen, dass durch tumorinduzierte Inflammation Veränderungen im Phänotyp von PMN induziert werden die Zahl und Funktion der Zellen verändern (36, 56). Ähnliche Beobachtungen machten Pillay et al. bei experimentell induzierter systemischer Inflammation (161). Die gewonnenen AAT-vermittelten Erkenntnisse auf das Verhalten der PMN müssen also auch vor diesem Hintergrund betrachtet werden.

Berücksichtigt man, dass AAT einen natürlichen zirkulierenden Inhibitor der Neutrophilen-Elastase darstellt und der durch Gendefekt vererbte hereditäre AAT-Mangel zu den genannten Langzeitschäden an Lunge und Leber führt, mit zum Teil drastischer Beeinflussung der Lebenserwartung dieser Patienten, die sich je nach Ausprägung und Mutation bereits in früher Kindheit manifestieren, müssen die Vor- und Nachteile für AAT-zielgerichtete Therapien rigoros bewertet werden (Kalsheker, 2009). Grundsätzlich erfüllt AAT im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion eine antiinflammatorische Funktion, jedoch bewirkt die gesteigerte AAT-Konzentration die gezeigten antiapoptotischen Wirkungen der PMN mit Verlängerung der Zirkulationslebensdauer. Die klinisch resultierende Neutrophilie steht in Assoziation mit dem postoperativen oder posttraumatischen SIRS gefolgt von einem möglichen MOF. Es wäre also denkbar über die Modulation der AAT-Konzentration eine

## Diskussion

klinische Besserung bei Patienten mit SIRS zu erzielen, unter der Voraussetzung, dass das Risiko und die Nebenwirkungen eines eventuell entstehenden Ungleichgewichts zwischen Proteasen und Antiproteasen im menschlichen Körper, im Rahmen einer solchen Therapie, abgeschätzt und beherrscht werden können. An dieser Stelle gilt es die Thematik intensiver zu untersuchen.

Daher wären weitere Studien erforderlich, die ein in-vivo-Trauma-Modell und konditionale AAT-Knockout-Mäuse verwenden, um die Rolle von AAT in Bezug auf die Pathogenese zu verstehen und damit einen Beitrag zum besseren Allgemeinverständnis der molekularen Pathophysiologie von Entzündungsreaktionen zu leisten. Das Verständnis der immunologischen Grundlagen der zu Grunde liegenden Prozesse ist eine wichtige Voraussetzung für die Verbesserung von Diagnostik und Therapie. Langfristig könnten diese Erkenntnisse eine Basis für die Identifizierung neuer potentieller Targets zur Limitierung der SIRS- und PMN-vermittelten Organschäden bilden.

## 5 Zusammenfassung

Kardiochirurgische Eingriffe unter Einsatz der Herzlungenmaschine führen allgemein beim Patienten zu spezifischen endokrinen und immunologischen Reaktionsmustern. Über die verstärkte Sekretion proinflammatorischer Zytokine, einer Aktivierung des Komplementsystems und verschiedener Immunzellen kann dies zu einer Hyperinflammation mit der Entstehung eines SIRS führen. Derartige perioperative Komplikationen sind mit einem erhöhten Risiko für Organdysfunktionen und zunehmender Morbidität sowie Mortalität in der postoperativen Phase assoziiert und verursachen auf operativen Intensivstationen jährliche Kosten in Milliardenhöhe.

Vor allem die Anzahl und die Zirkulationsdauer der PMN können im Rahmen dieser inflammatorischen Immunantwort um ein Vielfaches ansteigen. Gründe dafür sind eine verzögerte konstitutive Apoptose begleitet von einer übermäßig starken Abwehrreaktion der aktivierten PMN mit konsekutiver fortschreitender Schädigung der endothelialen Funktionen bis hin zum lebensbedrohlichen MOF.

Dass die Verzögerung der spontanen Apoptose peripherer PMN polytraumatisierten Patienten mit der Hemmung des intrinsischen, mitochondrialen Apoptosesignalweges einhergeht, die sich als Resistenz gegenüber des Breitspektrumkinaseinhibitors STS präsentiert, konnte mehrfach durch die Arbeitsgruppe belegt werden. Frühere Arbeiten deuteten zusätzlich darauf hin, dass zirkulierende Serumfaktoren während der Entzündung entscheidend an der Unterdrückung des Zelltods von PMN beteiligt sind, obwohl die Identität dieser antiapoptotischen Mediatoren schwer erfassbar sind. Vorversuche identifizierten das Akute-Phase-Protein AAT als wirksamen Suppressor der STS-induzierten Apoptose in humanen PMN.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher die molekularen Mechanismen untersucht werden, die an der Regulation der AAT-vermittelten verzögerten konstitutiven und STS-induzierten intrinsischen Apoptose in PMN gesunder Spender nach in vitro Stimulation mit einem Serumpool von SIRS-Patienten beteiligt sind. Es wurde gezeigt, dass die Proteinmengen von AAT in PMN, nach SIRS-Patienten Serumpool-Behandlung, deutlich erhöht sind. Die Mediatoren aus dem Serum wurden hier nicht näher charakterisiert. Erhöhte AAT-Proteinmengen korrelierten

## Zusammenfassung

mit einer Resistenz gegenüber des Apoptoseinduktors STS. Bemerkenswerterweise erhöhte die AAT-Depletion aus dem Serumpool der SIRS-Patienten die Empfindlichkeit der PMN für den STS-induzierten Zelltod. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass AAT die intrinsische Apoptose-Resistenz vermittelt, indem es die PKC/Akt-Inaktivierung als Reaktion auf die STS-Behandlung verhindert. Die anhaltende Akt-Aktivität in PMN führte zu einer Hemmung der Mcl-1-Phosphorylierung am Serin-159 und im Folgenden zur Hemmung des Proteinabbaus im Proteasomen. Weitere im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Regulationswege, wie die MAP-Kinase Erk1/2 und die Aktivierung der Caspasen -3, -7 und -9, wiesen keine AAT-abhängigen Regulationen auf.

Zusammenfassend stellen diese Ergebnisse eine neue zentrale Rolle des zirkulierenden AATs bei der Vermittlung des Überlebens durch Antagonisierung der proapoptotischen Wirkung des PKC-Inhibitors STS dar. Sie tragen zum besseren Verständnis der Apoptose-regulierenden Mechanismen bei, die eine PMN-Hyperaktivität und unkontrollierte Immunantwort in Folge einer Operation oder eines schweren Traumas auslösen. Außerdem könnten diese Erkenntnisse eine Basis für die Identifizierung neuer potentieller Targets zur Limitierung der SIRS- und PMN-vermittelten Organschäden bilden und somit langfristig Diagnostik und Therapie verbessern.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Akgul C, Edwards SW. (2003). Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.60(11):2402-8.
2. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. (2001). Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Letters*.487(3):318-22.
3. Alvarado-Kristensson M, Melander F, Leandersson K, Rönstrand L, Wernstedt C, Andersson T. (2004). p38-MAPK Signals Survival by Phosphorylation of Caspase-8 and Caspase-3 in Human Neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine*.199(4):449-58.
4. Aoshiba K, Yasui S, Hayashi M, Tamaoki J, Nagai A. (1999). Role of p38-Mitogen-Activated Protein Kinase in Spontaneous Apoptosis of Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*.162(3):1692-700.
5. Arbonés ML, Ord DC, Ley K, Ratech H, Maynard-Curry C, Otten G, Capon DJ, Teddert TF. (1994). Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity*.1(4):247-60.
6. Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graça-Souza AV. (2004). Heme Inhibits Human Neutrophil Apoptosis: Involvement of Phosphoinositide 3-Kinase, MAPK, and NF- $\kappa$ B. *The Journal of Immunology*.173(3):2023-30.
7. Ashkenazi A, Dixit VM. (1998). Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*.281(5381):1305-8.
8. Barbey-Morel C, Pierce JA, Campbell EJ, Perlmutter DH. (1987). Lipopolysaccharide modulates the expression of alpha 1 proteinase inhibitor and other serine proteinase inhibitors in human monocytes and macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*.166(4):1041-54.
9. Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, Jutila MA. (1994). Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *The Journal of Experimental Medicine*.180(5):1785-92.
10. Baumann H, Gauldie J. (1994). The acute phase response. *Immunology Today*.15(2):74-80.
11. Beckmann A, Funkat AK, Lewandowski J, Frie M, Ernst M, Hekmat K, Schiller W, Gummert JF, Cremer JT. (2015). Cardiac Surgery in Germany during 2014: A Report on Behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *The Thoracic and cardiovascular surgeon*.63(4):258-69.
12. Bergin DA, Reeves EP, Hurley K, Wolfe R, Jameel R, Fitzgerald S, McElvaney NG. (2014). The Circulating Proteinase Inhibitor  $\alpha$ -1 Antitrypsin Regulates Neutrophil Degranulation and Autoimmunity. *Science Translational Medicine*.6(217):217ra1-ra1.
13. Bhatia R, Dent C, Topley N, Pallister I. (2006). Neutrophil Priming for Elastase Release in Adult Blunt Trauma Patients. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*.60(3):590-6.
14. Birchall AM, Bishop J, Bradshaw D, Cline A, Coffey J, Elliott LH, Gibson VM, Greenham A, Hallam TJ, Harris W. (1994). Ro 32-0432, a selective and orally active inhibitor of protein kinase C prevents T-cell activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.268(2):922-9.
15. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for

the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*.101(6):1644-55.

16. Borregaard N. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*.33(5):657-70.

17. Bošković G, Twining SS. (1998). Local control of  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor levels: Regulation of  $\alpha$ 1- proteinase inhibitor in the human cornea by growth factors and cytokines. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.1403(1):37-46.

18. Bouma G, Ancliff PJ, Thrasher AJ, Burns SO. (2010). Recent advances in the understanding of genetic defects of neutrophil number and function. *British Journal of Haematology*.151(4):312-26.

19. Braun F, Bertin-Ciftci J, Gallouet A-S, Millour J, Juin P. (2011). Serum-Nutrient Starvation Induces Cell Death Mediated by Bax and Puma That Is Counteracted by p21 and Unmasked by Bcl-xL Inhibition. *PloS one*.6(8):e23577.

20. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*.303(5663):1532-5.

21. Broermann A, Winderlich M, Block H, Frye M, Rossaint J, Zarbock A, Cagna G, Linnepe R, Schulte D, Nottebaum AF, Vestweber D. (2011). Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*.208(12):2393-401.

22. Bruehl RE, Moore KL, Lorant DE, Borregaard N, Zimmerman GA, McEver RR, Bainton DF. (1997). Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Journal of leukocyte biology*.61(4):489-99.

23. Burns AR, Bowden RA, MacDonell SD, Walker DC, Odeunmi TO, Donnachie EM, Simon SI, Entman ML, Smith CW. (2000). Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *Journal of Cell Science*.113(1):45-57.

24. Buscher K, Riese SB, Shakibaei M, Reich C, Dervede J, Tauber R, Ley K. (2010). The Transmembrane Domains of L-selectin and CD44 Regulate Receptor Cell Surface Positioning and Leukocyte Adhesion under Flow. *Journal of Biological Chemistry*.285(18):13490-7.

25. Buyukates M, Acikgoz S, Kandemir O, Aktunc E, Ceylan E, Can M. (2008). Use of warm priming solution in open heart surgery: its effects on hemodynamics and acute inflammation. *Perfusion*.23(2):89-94.

26. Cantley LC. (2002). The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*.296(5573):1655-7.

27. Chang L, Karin M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*.410:37.

28. Charles I, Khalyfa A, Kumar DM, Krishnamoorthy RR, Roque RS, Cooper N, Agarwal N. (2005). Serum Deprivation Induces Apoptotic Cell Death of Transformed Rat Retinal Ganglion Cells via Mitochondrial Signaling Pathways. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*.46(4):1330-8.

29. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu G-L, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R, Ni J, Dixit VM. (1996). Signal Transduction by DR3, a Death Domain-Containing Receptor Related to TNFR-1 and CD95. *Science*.274(5289):990-2.

30. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. (2006). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death And Differentiation*.13:1396.

31. Chomczynski P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*.15(3):532-4, 6-7.
32. Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*.162(1):156-9.
33. Churpek MM, Zdravec FJ, Winslow C, Howell MD, Edelson DP. (2015). Incidence and Prognostic Value of the Systemic Inflammatory Response Syndrome and Organ Dysfunctions in Ward Patients. *American journal of respiratory and critical care medicine*.192(8):958-64.
34. Cicco N, Lindemann A, Content J, Vandebussche P, Lubbert M, Gauss J, Mertelsmann R, Herrmann F. (1990). Inducible production of interleukin-6 by human polymorphonuclear neutrophils: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha. *Blood*.75(10):2049-52.
35. Clemmensen SN, Jacobsen LC, Rørvig S, Askaa B, Christenson K, Iversen M, Jørgensen MH, Larsen MT, Deurs Bv, Østergaard O, Heegaard NH, Cowland JB, Borregaard N. (2011). Alpha - 1 - antitrypsin is produced by human neutrophil granulocytes and their precursors and liberated during granule exocytosis. *European Journal of Haematology*.86(6):517-30.
36. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau C-S, Verstegen NJM, Ciampricotti M, Hawinkels LJAC, Jonkers J, de Visser KE. (2015). IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*.522:345.
37. Comstedt P, Storgaard M, Lassen AT. (2009). The Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) in acutely hospitalised medical patients: a cohort study. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*.17:67.
38. Crawford J, Dale DC, Lyman GH. (2004). Chemotherapy-induced neutropenia. *Cancer*.100(2):228-37.
39. Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*.378:785.
40. Derouet M, Thomas L, Cross A, Moots RJ, Edwards SW. (2004). Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor Signaling and Proteasome Inhibition Delay Neutrophil Apoptosis by Increasing the Stability of Mcl-1. *Journal of Biological Chemistry*.279(26):26915-21.
41. Derouet M, Thomas L, Moulding DA, Akgul C, Cross A, Moots RJ, Edwards SW. (2006). Sodium Salicylate Promotes Neutrophil Apoptosis by Stimulating Caspase-Dependent Turnover of Mcl-1. *The Journal of Immunology*.176(2):957-65.
42. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase - 8 and cytochrome  $c$  by direct inhibition of distinct caspases. *The EMBO Journal*.17(8):2215-23.
43. Dewey JCF, Bussolari SR, Gimbrone JMA, Davies PF. (1981). The Dynamic Response of Vascular Endothelial Cells to Fluid Shear Stress. *Journal of Biomechanical Engineering*.103(3):177-85.
44. DiMartino M, Wolff C, Patil A, Nambi P. (1995). Effects of a protein kinase C inhibitor (PKCI) on the development of adjuvant-induced arthritis (AA) in rats. *Inflammation Research*.44(2):S123-S4.
45. Dinarello CA. (1984). Interleukin-1 and the Pathogenesis of the Acute-Phase Response. *New England Journal of Medicine*.311(22):1413-8.

46. du Bois R, Bernaudin J, Paakko P, Hubbard R, Takahashi H, Ferrans V, Crystal R. (1991). Human neutrophils express the alpha 1-antitrypsin gene and produce alpha 1-antitrypsin. *Blood*.77(12):2724-30.
47. Dubravec DB, Spriggs DR, Mannick JA, Rodrick ML. (1990). Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.87(17):6758-61.
48. Duffin R, Leitch AE, Fox S, Haslett C, Rossi AG. (2010). Targeting granulocyte apoptosis: mechanisms, models, and therapies. *Immunological Reviews*.236(1):28-40.
49. Dulhunty JM, Lipman J, Finfer S. (2008). Does severe non-infectious SIRS differ from severe sepsis? Results from a multi-centre Australian and New Zealand intensive care unit study. *Intensive care medicine*.34(9):1654-61.
50. Dunne WM, Jr. (2015). Laboratory Diagnosis of Sepsis? No SIRS, Not Just Yet. *Journal of clinical microbiology*.53(8):2404-9.
51. Eash KJ, Means JM, White DW, Link DC. (2009). CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood*.113(19):4711-9.
52. Epling-Burnette PK, Zhong B, Bai F, Jiang K, Bailey RD, Garcia R, Jove R, Djeu JY, Loughran TP, Wei S. (2001). Cooperative Regulation of Mcl-1 by Janus Kinase/STAT and Phosphatidylinositol 3-Kinase Contribute to Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Delayed Apoptosis in Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*.166(12):7486-95.
53. Ertel W, Keel M, Infanger M, Ungethüm U, Steckholzer U, Trentz O. (1998). Circulating Mediators in Serum of Injured Patients with Septic Complications Inhibit Neutrophil Apoptosis through Up-regulation of Protein-Tyrosine Phosphorylation. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*.44(5):767-76.
54. Faurschou M, Borregaard N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*.5(14):1317-27.
55. Fecho K, Cohen PL. (1998). Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils. *Journal of leukocyte biology*.64(3):373-83.
56. Finisguerra V, Di Conza G, Di Matteo M, Serneels J, Costa S, Thompson AAR, Wauters E, Walmsley S, Prenen H, Granot Z, Casazza A, Mazzone M. (2015). MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nature*.522:349.
57. Finlay TH, Tamir S, Kadner SS, Cruz MR, Yavelow J, Levitz M. (1993). alpha 1-Antitrypsin- and anchorage-independent growth of MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*.133(3):996-1002.
58. Frasch SC, Nick JA, Fadok VA, Bratton DL, Worthen GS, Henson PM. (1998). p38 Mitogen-activated Protein Kinase-dependent and -independent Intracellular Signal Transduction Pathways Leading to Apoptosis in Human Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*.273(14):8389-97.
59. Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y. (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*.263(34):18545-52.
60. Furze RC, Rankin SM. (2008). The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *The FASEB Journal*.22(9):3111-9.
61. Gabay C, Kushner I. (1999). Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *New England Journal of Medicine*.340(6):448-54.

62. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology*.12:1035.
63. Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, Whitlock BB, Frasch SC, Borregaard N, Marrack P, Bratton DL, Henson PM. (2004).  $\times$ Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt Regulates Its Activity and Apoptosis in Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*.279(20):21085-95.
64. Geering B, Gurzeler U, Federzoni E, Kaufmann T, Simon H-U. (2011). A novel TNFR1-triggered apoptosis pathway mediated by class IA PI3Ks in neutrophils. *Blood*.117(22):5953-62.
65. Geering B, Simon HU. (2011). Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death And Differentiation*.18:1457.
66. Ginzinger DG. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*.30(6):503-12.
67. Goetzl EJ. (1975). Plasma and cell derived inhibitors of human neutrophil chemotaxis. *Annals of the New York Academy of Sciences*.256(1):210-21.
68. Goldman A, Ursitti JA, Mozdanzowski J, Speicher DW. (2015). Electroblothing from Polyacrylamide Gels. *Current protocols in protein science*.82:10.7.1-6.
69. Gosselin EJ, Wardwell K, Rigby WF, Guyre PM. (1993). Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. *The Journal of Immunology*.151(3):1482-90.
70. Green DR. (1998). Apoptotic Pathways. *Cell*.94(6):695-8.
71. Greulich T, Groenewold W, Herr C, Koczulla AR, Vogelmeier CF, Bals R. Alpha-1-Antitrypsin Is Elevated In Patients With Systemic Inflammatory Response Syndrome. D53 SEPSIS: MECHANISMS AND IMPLICATIONS FOR MANAGEMENT2010. p. A6156-A.
72. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, Saraiva EM. (2009). Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.106(16):6748-53.
73. Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM, Johnston RB. (1984). Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *The Journal of Experimental Medicine*.160(6):1656-71.
74. Harada H, Grant S. (2003). Apoptosis regulators. *Rev Clin Exp Hematol*.7(2):117-38.
75. Harper PL, Taylor FB, Cadena RAD, Courtney M, Colman RW, Carrell RW. (1998). Recombinant Antitrypsin Pittsburgh Undergoes Proteolytic Cleavage during E. coli Sepsis and Fails to Prevent the Associated Coagulopathy in a Primate Model. *Thromb Haemost*.79(05):816-21.
76. Härter L, Keel M, Steckholzer U, Ungethuem U, Trentz O, Ertel W. (2002). Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases During Granulocyte Apoptosis in Patients with Severe Sepsis. *Shock*.18(5):401-6.
77. Heit B, Robbins SM, Downey CM, Guan Z, Colarusso P, Miller BJ, Jirik FR, Kubes P. (2008). PTEN functions to 'prioritize' chemotactic cues and prevent 'distraction' in migrating neutrophils. *Nature Immunology*.9:743.

78. Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS. (2007). Complete Identification of E-Selectin Ligands on Neutrophils Reveals Distinct Functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*.26(4):477-89.
79. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*.10(4):413-7.
80. Holsworth RE, Jr., Shecterle LM, St Cyr JA, Sloop GD. (2013). Importance of monitoring blood viscosity during cardiopulmonary bypass. *Perfusion*.28(1):91-2.
81. Holzapfel B, Wickert L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit*.37(2):120-6.
82. Hong C, Kidani Y, A-Gonzalez N, Phung T, Ito A, Rong X, Ericson K, Mikkola H, Beaven SW, Miller LS, Shao W-H, Cohen PL, Castrillo A, Tontonoz P, Bensinger SJ. (2012). Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice. *The Journal of Clinical Investigation*.122(1):337-47.
83. Hornstein T, Lehmann S, Philipp D, Detmer S, Hoffmann M, Peter C, Wesselborg S, Unfried K, Windolf J, Flohe S, Paunel-Gorgulu A. (2016). Staurosporine resistance in inflammatory neutrophils is associated with the inhibition of caspase- and proteasome-mediated Mcl-1 degradation. *Journal of leukocyte biology*.99(1):163-74.
84. Hsing C-H, Chen C-L, Lin W-C, Lin C-F. (2015). Propofol Treatment Inhibits Constitutive Apoptosis in Human Primary Neutrophils and Granulocyte-Differentiated Human HL60 Cells. *PLoS one*.10(6):e0129693.
85. Hurley K, Lacey N, O'Dwyer CA, Bergin DA, McElvaney OJ, O'Brien ME, McElvaney OF, Reeves EP, McElvaney NG. (2014). Alpha-1 Antitrypsin Augmentation Therapy Corrects Accelerated Neutrophil Apoptosis in Deficient Individuals. *The Journal of Immunology*.193(8):3978-91.
86. Ikari Y, Mulvihill E, Schwartz SM. (2001).  $\alpha$ 1-Proteinase Inhibitor,  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin, and  $\alpha$ 2-Macroglobulin Are the Antiapoptotic Factors of Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry*.276(15):11798-803.
87. Inoshita S, Takeda K, Hatai T, Terada Y, Sano M, Hata J, Umezawa A, Ichijo H. (2002). Phosphorylation and Inactivation of Myeloid Cell Leukemia 1 by JNK in Response to Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*.277(46):43730-4.
88. Jacobson PB, Kuchera SL, Metz A, Schächtele C, Imre K, Schrier DJ. (1995). Anti-inflammatory properties of Gö 6850: a selective inhibitor of protein kinase C. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.275(2):995-1002.
89. Janciauskiene S. (2001). Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*.1535(3):221-35.
90. Janciauskiene S, Larsson S, Larsson P, Virtala R, Jansson L, Stevens T. (2004). Inhibition of lipopolysaccharide-mediated human monocyte activation, in vitro, by  $\alpha$ 1-antitrypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.321(3):592-600.
91. Janciauskiene SM, Nita IM, Stevens T. (2007).  $\alpha$ 1-Antitrypsin, Old Dog, New Tricks:  $\alpha$ 1-ANTITRYPSIN EXERTS IN VITRO ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY IN HUMAN MONOCYTES BY ELEVATING cAMP. *Journal of Biological Chemistry*.282(12):8573-82.
92. Jimenez MF, Watson RW, Parodo J, Evans D, Foster D, Steinberg M, Rotstein OD, Marshall JC. (1997). Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*.132(12):1263-9; discussion 9-70.

93. Kalsheker NA. (2009).  $\alpha$ 1-Antitrypsin deficiency: best clinical practice. *Journal of Clinical Pathology*.62(10):865-9.
94. Kim C, Dinauer MC. (2001). Rac2 Is an Essential Regulator of Neutrophil Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Activation in Response to Specific Signaling Pathways. *The Journal of Immunology*.166(2):1223-32.
95. Klein JB, Rane MJ, Scherzer JA, Coxon PY, Kettritz R, Mathiesen JM, Buridi A, McLeish KR. (2000). Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Delays Neutrophil Constitutive Apoptosis Through Phosphoinositide 3-Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways. *The Journal of Immunology*.164(8):4286-91.
96. KNOELL DL, RALSTON DR, COULTER KR, WEWERS MD. (1998). Alpha 1-antitrypsin and Protease Complexation Is Induced by Lipopolysaccharide, Interleukin-1  $\beta$  , and Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  in Monocytes. *American journal of respiratory and critical care medicine*.157(1):246-55.
97. Kolaczkowska E, Kubes P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology*.13(3):159-75.
98. Kraft F, Schmidt C, Van Aken H, Zarbock A. (2015). Inflammatory response and extracorporeal circulation. *Best practice & research Clinical anaesthesiology*.29(2):113-23.
99. Kurokawa M, Kornbluth S. (2009). Caspases and Kinases in a Death Grip. *Cell*.138(5):838-54.
100. Kuwana T, Newmeyer DD. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*.15(6):691-9.
101. Kyriakis JM, Avruch J. (2012). Mammalian MAPK Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation: A 10-Year Update. *Physiological Reviews*.92(2):689-737.
102. Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*.227(5259):680-5.
103. Laffey JG, Boylan JF, Cheng DC. (2002). The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology*.97(1):215-52.
104. Lawlor MA, Alessi DR. (2001). PKB/Akt. a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?;114(16):2903-10.
105. Lefort CT, Rossaint J, Moser M, Petrich BG, Zarbock A, Monkley SJ, Critchley DR, Ginsberg MH, Fässler R, Ley K. (2012). Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood*.119(18):4275-82.
106. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. (2007). Systemic inflammation after trauma. *Injury*.38(12):1336-45.
107. Leuenroth SJ, Grutkoski PS, Ayala A, Simms HH. (2000). Suppression of PMN apoptosis by hypoxia is dependent on Mcl-1 and MAPK activity. *Surgery*.128(2):171-7.
108. Levy JH, Tanaka KA. (2003). Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *The Annals of Thoracic Surgery*.75(2):S715-S20.
109. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*.7:678.
110. Ley K, Smith E, Stark M. (2006). IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunologic Research*.34(3):229-42.
111. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*.91(4):479-89.

112. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF, Dunn AR. (1994). Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*.84(6):1737-46.
113. Liles WC, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ. (1996). Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine*.184(2):429-40.
114. Lisowska-Myjak B. (2005). AAT as a diagnostic tool. *Clinica Chimica Acta*.352(1):1-13.
115. Liu D, Li C, Chen Y, Burnett C, Liu XY, Downs S, Collins RD, Hawiger J. (2004). Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of biological chemistry*.279(46):48434-42.
116. Liu X, Zou H, Widlak P, Garrard W, Wang X. (1999). Activation of the Apoptotic Endonuclease DFF40 (Caspase-activated DNase or Nuclease): OLIGOMERIZATION AND DIRECT INTERACTION WITH HISTONE H1. *Journal of Biological Chemistry*.274(20):13836-40.
117. Lomas DA, Stone SR, Llewellyn-Jones C, Keogan M-T, Wang Z-m, Rubin H, Carrell RW, Stockley RA. (1995). The Control of Neutrophil Chemotaxis by Inhibitors of Cathepsin G and Chymotrypsin. *Journal of Biological Chemistry*.270(40):23437-43.
118. Lomonosova E, Chinnadurai G. (2009). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*.27:S2.
119. Lord PC, Wilmoth LM, Mizel SB, McCall CE. (1991). Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest*.87(4):1312-21.
120. MacCallum NS, Finney SJ, Gordon SE, Quinlan GJ, Evans TW. (2014). Modified criteria for the systemic inflammatory response syndrome improves their utility following cardiac surgery. *Chest*.145(6):1197-203.
121. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology*.11(8):519-31.
122. Marshall BT, Long M, Piper JW, Yago T, McEver RP, Zhu C. (2003). Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature*.423:190.
123. Matamala N, Martínez MT, Lara B, Pérez L, Vázquez I, Jimenez A, Barquín M, Ferrarotti I, Blanco I, Janciauskiene S, Martinez-Delgado B. (2015). Alternative transcripts of the SERPINA1 gene in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Journal of Translational Medicine*.13(1):211.
124. MATUTE-BELLO G, LILES WC, FRANK RADELLA I, STEINBERG KP, RUZINSKI JT, JONAS M, CHI EY, HUDSON LD, MARTIN TR. (1997). Neutrophil Apoptosis in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*.156(6):1969-77.
125. Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR. (2006). Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis by Destabilization of MCL-1. *Molecular Cell*.21(6):749-60.
126. Mestas J, Hughes CC. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*.172(5):2731-8.

127. Michalopoulos A, Stavridis G, Geroulanos S. (1998). Severe sepsis in cardiac surgical patients. *The European journal of surgery = Acta chirurgica.*164(3):217-22.
128. Minchinton R, Waters A. (1985). Autoimmune thrombocytopenia and neutropenia after bone marrow transplantation [letter]. *Blood.*66(3):752-.
129. Molmenti EP, Ziambaras T, Perlmutter DH. (1993). Evidence for an acute phase response in human intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry.*268(19):14116-24.
130. Morley JJ, Kushner I. (1982). SERUM C - REACTIVE PROTEIN LEVELS IN DISEASE\*. *Annals of the New York Academy of Sciences.*389(1):406-18.
131. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques.*24(6):954-8, 60, 62.
132. Moulding DA, Akgul C, Derouet M, White MRH, Edwards SW. (2001). BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *Journal of leukocyte biology.*70(5):783-92.
133. Moulding DA, Quayle JA, Hart CA, Edwards SW. (1998). Mcl-1 Expression in Human Neutrophils: Regulation by Cytokines and Correlation With Cell Survival. *Blood.*92(7):2495-502.
134. Mullis KB, Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology.*155:335-50.
135. Murray J, Barbara JAJ, Dunkley SA, Lopez AF, Van Ostade X, Condliffe AM, Dransfield I, Haslett C, Chilvers ER. (1997). Regulation of Neutrophil Apoptosis by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : Requirement for TNFR55 and TNFR75 for Induction of Apoptosis In Vitro. *Blood.*90(7):2772-83.
136. Nagata S. (1997). Apoptosis by Death Factor. *Cell.*88(3):355-65.
137. Namas R, Zamora R, Namas R, An G, Doyle J, Dick TE, Jacono FJ, Androulakis IP, Nieman GF, Chang S, Billiar TR, Kellum JA, Angus DC, Vodovotz Y.). Sepsis: Something old, something new, and a systems view. *Journal of Critical Care.*27(3):314.e1-.e11.
138. Nathan C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology.*6:173.
139. Nicholson DW, Thornberry NA. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences.*22(8):299-306.
140. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of immunological methods.*139(2):271-9.
141. Nifoussi SK, Vrana JA, Domina AM, De Biasio A, Gui J, Gregory MA, Hann SR, Craig RW. (2012). Thr 163 Phosphorylation Causes Mcl-1 Stabilization when Degradation Is Independent of the Adjacent GSK3-Targeted Phosphodegron, Promoting Drug Resistance in Cancer. *PloS one.*7(10):e47060.
142. Nita IM, Serapinas D, Janciauskiene SM. (2007).  $\alpha$ 1-Antitrypsin regulates CD14 expression and soluble CD14 levels in human monocytes in vitro. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*39(6):1165-76.
143. O'Neill S, O'Neill AJ, Conroy E, Brady HR, Fitzpatrick JM, Watson RWG. (2000). Altered caspase expression results in delayed neutrophil apoptosis in acute pancreatitis. *Journal of leukocyte biology.*68(1):15-20.
144. Ottaviani S, Gorrini M, Scabini R, Kadija Z, Paracchini E, Mariani F, Ferrarotti I, Luisetti M. (2011). C reactive protein and alpha1-antitrypsin: relationship between levels and gene variants. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine.*157(6):332-8.

145. Paparella D, Yau TM, Young E. (2002). Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*.21(2):232-44.
146. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in Immunology*.30(11):513-21.
147. Parfrey H, Mahadeva R, Lomas DA. (2003).  $\alpha$ 1-Antitrypsin deficiency, liver disease and emphysema. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*.35(7):1009-14.
148. Paunel-Görgülü A, Flohé S, Scholz M, Windolf J, Lögters T. (2011). Increased serum soluble Fas after major trauma is associated with delayed neutrophil apoptosis and development of sepsis. *Critical Care*.15(1):R20.
149. Paunel-Gorgulu A, Kirichevska T, Logters T, Windolf J, Flohe S. (2012). Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*.18:325-35.
150. Paunel-Görgülü A, Zörnig M, Lögters T, Altrichter J, Rabenhorst U, Cinatl J, Windolf J, Scholz M. (2009). Mcl-1-Mediated Impairment of the Intrinsic Apoptosis Pathway in Circulating Neutrophils from Critically Ill Patients Can Be Overcome by Fas Stimulation. *The Journal of Immunology*.183(10):6198-206.
151. Perlmutter DH, Cole FS, Kilbridge P, Rossing TH, Colten HR. (1985). Expression of the alpha 1-proteinase inhibitor gene in human monocytes and macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.82(3):795-9.
152. Perlmutter DH, Punsal PI. (1988). Distinct and additive effects of elastase and endotoxin on expression of alpha 1 proteinase inhibitor in mononuclear phagocytes. *Journal of Biological Chemistry*.263(31):16499-503.
153. Petrache I, Fijalkowska I, Medler TR, Skirball J, Cruz P, Zhen L, Petrache HI, Flotte TR, Tudor RM. (2006).  $\alpha$ -1 Antitrypsin Inhibits Caspase-3 Activity, Preventing Lung Endothelial Cell Apoptosis. *The American Journal of Pathology*.169(4):1155-66.
154. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*.30(9):e36.
155. Phelan K, May KM. (2017). *Mammalian Cell Tissue Culture. Current protocols in human genetics*.94:A.3g.1-a.3g.22.
156. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. (2006). Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *The Journal of Experimental Medicine*.203(12):2569-75.
157. Phillipson M, Heit B, Parsons SA, Petri B, Mullaly SC, Colarusso P, Gower RM, Neely G, Simon SI, Kubes P. (2009). Vav1 Is Essential for Mechanotactic Crawling and Migration of Neutrophils out of the Inflamed Microvasculature. *The Journal of Immunology*.182(11):6870-8.
158. Phillipson M, Kaur J, Colarusso P, Ballantyne CM, Kubes P. (2008). Endothelial Domes Encapsulate Adherent Neutrophils and Minimize Increases in Vascular Permeability in Paracellular and Transcellular Emigration. *PLoS one*.3(2):e1649.
159. Phillipson M, Kubes P. (2011). The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine*.17:1381.

160. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L. (2010). In vivo labeling with  $2H_2O$  reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*.116(4):625-7.
161. Pillay J, Ramakers BP, Kamp VM, Loi ALT, Lam SW, Hietbrink F, Leenen LP, Tool AT, Pickkers P, Koenderman L. (2010). Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *Journal of leukocyte biology*.88(1):211-20.
162. Pittet D, Rangel-Frausto S, Li N, Tarara D, Costigan M, Rempe L, Jebson P, Wenzel RP. (1995). Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. *Intensive care medicine*.21(4):302-9.
163. Pollack A, Ciancio G. (1990). Cell cycle phase-specific analysis of cell viability using Hoechst 33342 and propidium iodide after ethanol preservation. *Methods in cell biology*.33:19-24.
164. Proebstl D, Voisin M-B, Woodfin A, Whiteford J, D'Acquisto F, Jones GE, Rowe D, Nourshargh S. (2012). Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*.
165. Ramadori G, Christ B. (1999). Cytokines and the hepatic acute-phase response. *Seminars in liver disease*.19(2):141-55.
166. Ray S, Reddy PJ, Jain R, Gollapalli K, Moiyadi A, Srivastava S. (2011). Proteomic technologies for the identification of disease biomarkers in serum: Advances and challenges ahead. *PROTEOMICS*.11(11):2139-61.
167. Renshaw SA, Parmar JS, Singleton V, Rowe SJ, Dockrell DH, Dower SK, Bingle CD, Chilvers ER, Whyte MKB. (2003). Acceleration of Human Neutrophil Apoptosis by TRAIL. *The Journal of Immunology*.170(2):1027-33.
168. Riccardi C, Nicoletti I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*.1(3):1458-61.
169. Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY. (2000). Reference distributions for the positive acute phase serum proteins,  $\alpha 1$  - acid glycoprotein (orosomuroid),  $\alpha 1$  - antitrypsin, and haptoglobin: A practical, simple, and clinically relevant approach in a large cohort. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*.14(6):284-92.
170. Robinson DR, Wu Y-M, Lin S-F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*.19:5548.
171. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. (2011). Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology*.32(10):452-60.
172. Salvesen GS, Dixit VM. (1997). Caspases: Intracellular Signaling by Proteolysis. *Cell*.91(4):443-6.
173. Sarabhai T, Peter C, Bär AK, Windolf J, Relja B, Wesselborg S, Wahlers T, Paunel-Gorgulu A. (2017). Serum alpha-1 Antitrypsin (AAT) antagonizes intrinsic apoptosis induction in neutrophils from patients with systemic inflammatory response syndrome. *PloS one*.12(5):e0177450.
174. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest*.83(3):865-75.
175. Schamberger CJ, Gerner C, Cerni C. (2005). Caspase-9 plays a marginal role in serum starvation-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*.302(1):115-28.

176. Shi J, Gilbert GE, Kokubo Y, Ohashi T. (2001). Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood*.98(4):1226-30.
177. Siegel RM, Ka-Ming Chan F, Chun HJ, Lenardo MJ. (2000). The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nature Immunology*.1:469.
178. Silverman EK, Sandhaus RA. (2009). Clinical practice. Alpha1-antitrypsin deficiency. *The New England journal of medicine*.360(26):2749-57.
179. Simon H-U. (2003). Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunological Reviews*.193(1):101-10.
180. Simpson SQ. (2017). SIRS in the Time of Sepsis-3. *Chest*.
181. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*.315(8):801-10.
182. Smith BJ. (1984). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*.1:41-55.
183. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*.150(1):76-85.
184. Squier MKT, Sehnert AJ, Cohen JJ. (1995). Apoptosis in leukocytes. *Journal of leukocyte biology*.57(1):2-10.
185. Stark K, Eckart A, Haidari S, Tirniceriu A, Lorenz M, von Brühl M-L, Gärtner F, Khandoga AG, Legate KR, Pless R, Hepper I, Lauber K, Walzog B, Massberg S. (2012). Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and instruct them with pattern-recognition and motility programs. *Nature Immunology*.14:41.
186. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. (2005). Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*.22(3):285-94.
187. Stockley RA, Shaw J, Afford SC, Morrison HM, Burnett D. (1990). Effect of Alpha-1-Proteinase Inhibitor on Neutrophil Chemotaxis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*.2(2):163-70.
188. Subramaniam D, Virtala R, Pawłowski K, Clausen IG, Warkentin S, Stevens T, Janciauskiene S. (2008). TNF- $\alpha$ -induced self expression in human lung endothelial cells is inhibited by native and oxidized  $\alpha$ 1-antitrypsin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*.40(2):258-71.
189. Sumagin R, Sarelius IH. (2010). Intercellular Adhesion Molecule-1 Enrichment near Tricellular Endothelial Junctions Is Preferentially Associated with Leukocyte Transmigration and Signals for Reorganization of These Junctions To Accommodate Leukocyte Passage. *The Journal of Immunology*.184(9):5242-52.
190. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology*.31(8):318-24.
191. Thewissen M, Damoiseaux J, van de Gaar J, Tervaert JWC. (2011). Neutrophils and T cells: Bidirectional effects and functional interferences. *Molecular Immunology*.48(15):2094-101.
192. Thomas LW, Lam C, Edwards SW. (2010). Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Letters*.584(14):2981-9.
193. Thompson C. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*.267(5203):1456-62.

194. Tilg H, Vannier E, Vachino G, Dinarello CA, Mier JW. (1993). Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Experimental Medicine*.178(5):1629-36.
195. Toldo S, Seropian IM, Mezzaroma E, Van Tassell BW, Salloum FN, Lewis EC, Voelkel N, Dinarello CA, Abbate A. (2011). Alpha-1 antitrypsin inhibits caspase-1 and protects from acute myocardial ischemia–reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.51(2):244-51.
196. Träger K, Schütz C, Fischer G, Schröder J, Skrabal C, Liebold A, Reinelt H. (2016). Cytokine Reduction in the Setting of an ARDS-Associated Inflammatory Response with Multiple Organ Failure. *Case Reports in Critical Care*.2016:4.
197. Trzeciak S, Zanotti-Cavazzoni S, Parrillo JE, Dellinger RP. (2005). Inclusion criteria for clinical trials in sepsis: did the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine consensus conference definitions of sepsis have an impact? *Chest*.127(1):242-5.
198. Twining SS, Fukuchi T, Yue BYJT, Wilson PM, Boskovic G. (1994). Corneal synthesis of  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor ( $\alpha$ 1-antitrypsin). *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.35(2):458-62.
199. van Buul JD, Allingham MJ, Samson T, Meller J, Boulter E, García-Mata R, Burrige K. (2007). RhoG regulates endothelial apical cup assembly downstream from ICAM1 engagement and is involved in leukocyte trans-endothelial migration. *The Journal of Cell Biology*.178(7):1279-93.
200. Van Molle W, Libert C, Fiers W, Brouckaert P. (1997). Alpha 1-acid glycoprotein and alpha 1-antitrypsin inhibit TNF-induced but not anti-Fas-induced apoptosis of hepatocytes in mice. *The Journal of Immunology*.159(7):3555-64.
201. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. (2000). Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell*.102(1):43-53.
202. Wallen CA, Higashikubo R, Dethlefsen LA. (1982). Comparison of two flow cytometric assays for cellular RNA--acridine orange and propidium iodide. *Cytometry*.3(3):155-60.
203. Wang S, Voisin M-B, Larbi KY, Dangerfield J, Scheiermann C, Tran M, Maxwell PH, Sorokin L, Nourshargh S. (2006). Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine*.203(6):1519-32.
204. Watson RWG, Rotstein OD, Jimenez M, Parodo J, Marshall JC. (1997). Augmented Intracellular Glutathione Inhibits Fas-Triggered Apoptosis of Activated Human Neutrophils. *Blood*.89(11):4175-81.
205. Wei MC, Zong W-X, Cheng EH-Y, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science*.292(5517):727-30.
206. Wei S, Liu JH, Epling-Burnette PK, Gamero AM, Ussery D, Pearson EW, Elkabani ME, Diaz JI, Djeu JY. (1996). Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Immunology*.157(11):5155-62.
207. White R, Lee D, Habicht GS, Janoff A. (1981). Secretion of Alpha1 - Proteinase Inhibitor by Cultured Rat Alveolar Macrophages. *American Review of Respiratory Disease*.123(4):447-9.

208. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*.22(3):474-6, 8-81.
209. Williams MR, Azcutia V, Newton G, Alcaide P, Luscinskas FW. (2011). Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol*.32(10):461-9.
210. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*.80(5):617-53.
211. Woodfin A, Voisin M-B, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapouli F-M, Nash GB, Chavakis T, Albelda SM, Rainger GE, Meda P, Imhof BA, Nourshargh S. (2011). The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nature Immunology*.12:761.
212. Woodfin A, Voisin M-B, Imhof BA, Dejana E, Engelhardt B, Nourshargh S. (2009). Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood*.113(24):6246-57.
213. Wout EFAvt, Schadewijk Av, Savage NDL, Stolk J, Hiemstra PS. (2012).  $\alpha$ 1-Antitrypsin Production by Proinflammatory and Antiinflammatory Macrophages and Dendritic Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*.46(5):607-13.
214. Yago T, Zarnitsyna VI, Klopocki AG, McEver RP, Zhu C. (2007). Transport Governs Flow-Enhanced Cell Tethering through L-Selectin at Threshold Shear. *Biophysical Journal*.92(1):330-42.
215. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW. (2005). ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- $\alpha$ -activated vascular endothelium under flow. *Blood*.106(2):584-92.
216. Youle RJ, Strasser A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.9:47.
217. Zaman S, Wang R, Gandhi V. (2014). Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leukemia & Lymphoma*.55(9):1980-92.
218. Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A. (2011). Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*.118(26):6743-51.
219. Zhang B, Lu Y, Campbell-Thompson M, Spencer T, Wasserfall C, Atkinson M, Song S. (2007).  $\alpha$ 1-Antitrypsin Protects  $\beta$ -Cells From Apoptosis. *Diabetes*.56(5):1316-23.
220. Zhao Y, Altman BJ, Coloff JL, Herman CE, Jacobs SR, Wieman HL, Wofford JA, Dimascio LN, Ilkayeva O, Kelekar A, Reya T, Rathmell JC. (2007). Glycogen Synthase Kinase 3 $\alpha$  and 3 $\beta$  Mediate a Glucose-Sensitive Antiapoptotic Signaling Pathway To Stabilize Mcl-1. *Molecular and Cellular Biology*.27(12):4328-39.

## 7 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Form einer Publikation in der internationalen Online-Fachzeitschrift PLOS ONE am 11. Mai 2017 vorgestellt.

### **Serum $\alpha$ -1 Antitrypsin (AAT) antagonizes intrinsic apoptosis induction in neutrophils from patients with systemic inflammatory response syndrome**

Theresia Sarabhai, Christoph Peter, Anne-Kathrin Bär, Joachim Windolf, Borna Relja, Sebastian Wesselborg, Thorsten Wahlers, Adnana Paunel-Görgülü

PLOS ONE 12(5): e0177450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177450>

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Venn-Diagramm SIRS – Sepsis – Infektion.....	16
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung der PMN-Tötungsmechanismen...	20
Abbildung 1.3	Schematische Darstellung der Leukozyten- Rekrutierungskaskade und der beteiligten endothelialen und neutrophilen Schlüsselmoleküle.....	21
Abbildung 1.4	Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Signalwegs.....	28
Abbildung 2.1	Schematische Darstellung der Komponentenverteilung vor (links) und nach (rechts) der Dichtegradientenzentrifugation...	48
Abbildung 2.2	Neubauer- <i>improved</i> -Zählkammer.....	50
Abbildung 2.3	Ausbildung des intensiv lila gefärbten BCA-Cu <sup>+</sup> -Chelatkomplex.....	53
Abbildung 3.1	Serum-AAT vermittelte STS-Resistenz in PMN.....	63
Abbildung 3.2	Wirkung von AAT auf die Aktivität der Kinasen pAkt (3.2a) und pErk1/2 (3.2b).....	64
Abbildung 3.3	Wirkung von AAT auf die Mcl-1-Phosphorylierung.....	66
Abbildung 3.4	Wirkung von AAT auf die Aktivität der Caspase-9 (3.4a) und Caspase-3/-7 (3.4b).....	68
Abbildung 3.5	SIRS-Patientenserum hat keinen Einfluss auf die AAT- Genexpression in PMN gesunder Spender.....	69
Abbildung 3.6	SIRS-Patientenserum induziert intrinsische Apoptose- Resistenz durch Hochregulation der AAT-Proteinexpression in PMN gesunder Spender.....	70

## Anhang

Abbildung 3.7	AAT-Konzentrationsanstieg der in SIRS-Patientenserum kultivierten PMN wird ausschließlich durch intrazelluläre Proteinexpression verursacht.....	71
---------------	--	----

### 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	AAT-Serumkonzentrationen vor und nach Depletion aus Serumpool von SIRS-Patienten.....	62
-------------	---	----

Lebenslauf

## **9 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Anne-Kathrin Bär